

**CRISPR/Cas9 und Zinkfinger-Nukleasen**  
**für die gezielte Genstilllegung in *Chlamydomonas reinhardtii***

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)

im Fach Biophysik

eingereicht an der  
Lebenswissenschaftlichen Fakultät  
Der Humboldt-Universität zu Berlin

Von

**Diplom Biologe Andre Greiner**

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin  
Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät  
Prof. Dr. Richard Lucius

Gutachter:

1. Prof. Peter Hegemann
2. Prof. Thomas Buckhout
3. Prof. Georg Kreimer

eingereicht am: 27.10.2014

Tag der mündlichen Prüfung: 09.02.2015



## **Widmung**

*Ich widme diese Arbeit*

*meiner Frau Christine, meinem Sohn Lukas*

*und meinen Eltern.*

## Zusammenfassung

Die einzellige Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* ist ein vielseitiger Modellorganismus sowohl in der Grundlagenforschung als auch für biotechnologische Anwendung. Für die genetische Veränderung wurden verschiedene Methoden entwickelt, jedoch ist die gezielte Modifikation kerncodierter Gene immernoch sehr schwierig. In dieser Arbeit wird eine Strategie vorgestellt, die es ermöglicht, kerncodierte Gene in *Chlamydomonas* gezielt mit sequenzspezifischen Zinkfinger-Nukleasen zu verändern. Das *COP3*-Gen, welches den lichtaktivierbaren Ionenkanal Kanalrhodopsin-1 codiert, diente hierbei als Zielsequenz der für die Deletion hergestellten Zinkfinger-Nukleasen. Um eine Charakterisierung der ZFNs zu ermöglichen, wurde ein Modelstamm generiert, der ein inaktiviertes Markergen enthält. Die Inaktivierung erfolgte hierbei durch Insertion der *COP3*-ZFN Zielsequenz. Die Transformation dieses Modellstamms mit ZFN codierender Plasmid-DNA und einem Reparatur-Template ermöglichte die Wiederherstellung der Markeraktivität und eine Selektion Antibiotika-resistenter Kolonien. Wenn in diesen Experimenten zusätzlich ein *COP3* veränderndes Template benutzt wurde, enthielt 1% der analysierten Klone ein mutiertes *COP3*-Gen.

Der *Chlamydomonas* Augenfleck ist ein lichtsensitives Organell mit entscheidender Funktion für die phototaktische Orientierung der Alge. Eine Deletionsmutante des Blaulicht-Photorezeptors Phototropin zeigte in Experimenten eine veränderte Regulation der lichtabhängigen Augenfleckgröße. Durch Komplementierung der Phototropin-Dysfunktion konnte der lichtabhängige Regulationsprozess wiederhergestellt werden. Die Expression der Phototropin-Kinasedomäne führte zu einer lichtunabhängigen Reduktion der Augenfleckfläche. Interessanterweise führte auch die Expression der N-terminalen LOV-Domänen zu einer geänderten Regulation des Augenflecks und der Phototaxis. Dies deutet, zusätzlich zur Lichtregulation der Kinasedomäne, auf eine zelluläre Signalfunktion der LOV-Domänen hin.

Schlagwörter:

Zinkfinger-Nukleasen, Kanalrhodopsin-1, *Chlamydomonas*, Phototropin



## Abstract

The unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* is a versatile model for fundamental and biotechnological research. A wide toolset for genetic manipulation has been developed for this alga, but specific modification of nuclear genes is still not routinely possible. Here we present a nuclear gene targeting strategy for *Chlamydomonas* that is based on the application of zinc-finger nucleases (ZFNs). Initially, we designed a set of ZFNs for targeting the *COP3* gene that encodes the light-activated ion channel channelrhodopsin-1. To evaluate the designed ZFNs, we constructed a model strain by inserting a non-functional selection marker interspaced with a short *COP3* target sequence into the nuclear genome. Upon co-transformation of this recipient strain with the engineered ZFNs and a DNA repair template, we were able to restore marker activity and select antibiotic resistant clones with active nucleases. In cases where cells were co-transformed with a modified *COP3* template, 1% of these clones contained a modified *COP3* locus as well.

The eyespot of *Chlamydomonas* is a light-sensitive organelle important for phototactic orientation of the alga. Here we found that eyespot size is downregulated in light. In a strain in which the blue light photoreceptor phototropin was deleted, the light regulation of the eyespot size was affected. We restored this dysfunction in different phototropin complementation experiments. Complementation with the phototropin kinase fragment reduced the eyespot size, independent of light. Interestingly, overexpression of the N-terminal LOV-domains alone also affected eyespot size and phototaxis, suggesting that aside from activation of the kinase domain, they fulfill an independent signaling function in the cell. We propose that phototropin is a light regulator of phototaxis that desensitizes the eyespot when blue light intensities increase.

Keywords:

zinc-finger nucleases, channelrhodopsin-1, *Chlamydomonas*, phototropin

## Inhaltsverzeichnis

<b>Widmung .....</b>	<b>iii</b>
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>iv</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>v</b>
<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>vi</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>ix</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>xiii</b>
<b>Vorwort .....</b>	<b>xv</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Der Modellorganismus <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	1
1.1.1 Der Augenfleck und die Kanalrhodopsine .....	4
1.1.2 Phototropin und der Lebenszyklus .....	7
1.1.3 <i>Chlamydomonas</i> -Photorezeptoren .....	10
1.2 Mechanismen zur Erhaltung der genetischen Information .....	14
1.2.1 Die Organisation des eukaryotischen Genoms .....	14
1.2.2 DNA-Doppelstrangbruch Reparatur .....	15
1.2.2.1 Homologe Rekombination .....	17
1.2.2.1.1 Prä-Synapsis .....	18
1.2.2.1.2 Synapsis .....	20
1.2.2.1.3 Post-Synapsis .....	21
1.2.2.2 Nicht-homologe Endverknüpfung .....	22
1.3 Generierung sequenzspezifischer DNA-Doppelstrangbrüche .....	23
1.3.1 Zinkfinger-Nukleasen .....	24
1.3.2 TALENs .....	27
1.3.3 CRISPR/Cas9 .....	29
1.3.3.1 Die Cas9-Endonuklease .....	29
1.3.3.2 Die guideRNA .....	31
1.4 Angewandte Methoden der Genstilllegung in <i>Chlamydomonas</i> .....	32
1.4.1 Einzelsträngige Plasmid-DNA .....	32
1.4.2 Insertions-Mutagenese und TILLING .....	32
1.4.3 RNA-Interferenz .....	34
<b>2. Zielstellung .....</b>	<b>35</b>
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>36</b>
3.1 Verwendung sequenzspezifischer Zinkfinger-Nukleasen .....	36
3.1.1 <i>COP3</i> -ZFNs .....	36
3.1.2 <i>In Vivo</i> Evaluierung .....	37

3.1.3	Optimierung .....	40
3.1.4	Sequenzspezifische Insertionen oder Deletionen.....	43
3.2	Modellsystem.....	48
3.2.1	<i>Cop5</i> -ZFNs und -TALENs.....	48
3.2.2	Optimierung der Modellkassette.....	50
3.2.3	p80- und p81-Modellstämme.....	59
3.3	CRISPR/Cas9.....	61
3.3.1	Guide RNA.....	61
3.3.1.1	Transkription der gRNA .....	61
3.3.1.2	Klonierungsstrategien.....	63
3.3.1.3	U6-Promotoren.....	66
3.3.2	Expression von Cas9 und Lokalisation im Nukleus.....	67
3.3.2.1	Konstitutive Expression von Cas9 .....	67
3.3.2.2	Kernlokalisation .....	70
3.3.2.3	Deletionsexperimente .....	72
3.3.2.4	High-Throughput-Sequenzierungen .....	76
3.3.2.5	Cas9 im Modellsystem .....	78
3.4	Genom Sequenzierung des Stammes CW15-302 .....	82
3.5	Diurnale Photorezeptor-mRNA Transkription.....	85
3.6	Charakterisierung von $\Delta PHOT^{G5}$ .....	89
3.6.1	Phototropin reguliert die Expression von LHCSR3.....	89
3.6.2	Phototropin reguliert die Augenfleckgröße .....	92
3.6.2.1	Veränderlichkeit ist Blaulicht reguliert .....	92
3.6.2.2	Regulation durch die Kinase .....	95
3.6.2.3	Regulation durch LOV1+LOV2 .....	98
3.6.2.4	Phototropin Überexpression .....	98
3.6.2.5	Regulation von Kanalrhodopsin-1 .....	99
3.6.2.6	Phototaxis.....	102
3.7	Charakterisierung von $\Delta COP3$ .....	105
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>107</b>
4.1	Zinkfinger-Nukleasen für die Deletion von <i>COP3</i> .....	107
4.2	Arbeiten am Modellsystem .....	110
4.3	CRISPR/Cas9 .....	116
4.4	Physiologische Analysen von $\Delta PHOT$ und $\Delta COP3$ .....	129
4.4.1	Phototropin und der Augenfleck.....	129
4.4.2	Phototropin und die Kanalrhodopsine .....	130
<b>5.</b>	<b>Material und Methode .....</b>	<b>132</b>
5.1	Molekularbiologie.....	132

5.1.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	132
5.1.2	Restriktionsverdau der DNA.....	132
5.1.3	Ligation von DNA-Fragmenten.....	132
5.1.4	Plasmid-DNA.....	132
5.1.5	DNA-Gelelektrophorese.....	133
5.2	Biochemische Methoden.....	133
5.2.1	Bestimmung von Proteinkonzentrationen .....	133
5.2.2	Polyacrylamid Gel Elektrophorese (PAGE).....	134
5.2.3	Comassie Brilliant Blau Färbung.....	134
5.2.4	Western-Blot-Analysen.....	135
5.2.5	Ponceau-S Färbung.....	135
5.2.6	Immunologische Proteindetektion.....	135
5.2.7	Zellkultur und Medien .....	135
5.2.8	Transformation von <i>C. reinhardtii</i> .....	136
5.2.9	Isolation genomischer DNA aus <i>C. reinhardtii</i> .....	137
5.2.10	Phototaxis Assay .....	137
<b>6.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>139</b>
6.1	Stammspezifische Augenfleckgröße.....	139
6.2	DNA-Sequenzen .....	139
6.3	Barcode-Primersequenzen .....	144
	<b>Danksagung .....</b>	<b>145</b>
	<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>146</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>147</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Illustration einer <i>Chlamydomonas</i> Zelle.....	1
Abbildung 2 Intraflagellare Transportprozesse.....	3
Abbildung 3 Der Augenfleck und Kanalrhodopsin-1 .....	5
Abbildung 4 Der Lebenszyklus und Phototropin .....	8
Abbildung 5 Phototropin Struktur .....	9
Abbildung 6 <i>Chlamydomonas</i> Photorezeptoren .....	13
Abbildung 7 „Chromatin Assembly Factor 1“ .....	15
Abbildung 8 Übersicht der DNA-Doppelstrangbruch Reparaturmechanismen .....	16
Abbildung 9 Die BRCA2 und Rad51 Proteine .....	18
Abbildung 10 Post-Synapsis: Auflösung der Holliday-Struktur.....	21
Abbildung 11 DNA-Doppelstrangbrüche .....	23
Abbildung 12 Zinkfinger-Nukleasen .....	24
Abbildung 13 TAL-Effektordomänen .....	27
Abbildung 14 Das CRISPR Immunsystem und Cas9.....	30
Abbildung 15 Promotorelemente der RNAPIII.....	31
Abbildung 16 Schematische Darstellung Modellsystem p60 .....	39
Abbildung 17 Synchronisation ZF37.....	41
Abbildung 18 Vergleich FokI-Varianten .....	43
Abbildung 19 Cel1-Assay.....	44
Abbildung 20 Template-DNA Design .....	46

Abbildung 21 <i>COP5</i> spezifische ZFNs und TALENs.....	49
Abbildung 22 Schematische Darstellung der Modellkassetten p60 und p70.....	50
Abbildung 23 Schematische Darstellung der Modellkassetten p71 und p72.....	53
Abbildung 24 Schematische Darstellung und Vergleich p60, p73 und p74.....	55
Abbildung 25 Schematische Darstellung der Modellkassetten p80 und p81 .....	57
Abbildung 26 Transformationen im Modellsystem p80 und p81 .....	60
Abbildung 27 Homologien der chromosomalen U6-snrNAs Sequenzen. ....	62
Abbildung 28 Nachweis der gRNA Transkription mittels qRT-PCR.....	63
Abbildung 29 Klonierungsstrategien .....	64
Abbildung 30 Analysen der heterologen Expression von Cas9 in <i>C. reinhardtii</i> .....	68
Abbildung 31 Kernlokalisierung von Cas9YFP .....	71
Abbildung 32 T7EI Assay Phototropin .....	73
Abbildung 33 Western-Blot-Analysen PT1 und PT2 Versuche .....	75
Abbildung 34 Multiplexed-Barcode-Sequencing.....	77
Abbildung 35 Cas9 pLSLR .....	80
Abbildung 36 Cas9 RNA Transformationen .....	82
Abbildung 37 Auswertung Mutationen in Stamm CW15-302 .....	85
Abbildung 38 Übersicht der RPKM normalisierten Transkriptlevel .....	86
Abbildung 39 Diurnale Änderung der Photorezeptor mRNA .....	88
Abbildung 40 Chlamydomonas Phototropin reguliert die LHCSR3 Expression .....	90
Abbildung 41 Lichtabhängigkeit der Augenfleckgröße .....	94

Abbildung 42 Komplementierung von $\Delta PHOT^{G5}$ .....	96
Abbildung 43 Lichtabhängige Regulation der Chr1-Proteinmenge .....	100
Abbildung 44 Analyse des Chr2-Gehaltes in $\Delta COP3$ .....	101
Abbildung 45 Phototaxis .....	104
Abbildung 46 Phototaktisches Verhalten einer motilen $\Delta COP3$ -Mutante .....	106
Abbildung 47 DSB induced small RNAs .....	109
Abbildung 48 Reportersystem .....	111
Abbildung 49 Analyse von <i>fas1</i> und <i>fas2</i> in <i>A. thaliana</i> .....	114
Abbildung 50 Analyse der verwendeten gRNA .....	119
Abbildung 51 Messungen der Augenfleckgröße .....	139

## Nomenklatur

In Übereinstimmung mit den von der *Chlamydomonas*-Gesellschaft festgelegten Regeln zur Nomenklatur von Genen (<http://www.chlamy.org/nomenclature.html>) werden in dieser Arbeit DNA- und Protein-Sequenzen folgendermaßen kenntlich gemacht:

Nomenklatur	Format	Beispiel
<i>C. reinhardtii</i> kerncodiertes <b>Gen</b>	GROSSBUCHSTABEN KURSIV	ARG7
<i>C. reinhardtii</i> <b>Protein</b>	GROSSBUCHSTABEN NICHT KURSIV	ARG7
Heterologes Gen	<i>Spezies Initialen hochgestellt; klein kursiv</i>	<sup>Sh</sup> ble
Heterologes Protein	GROSSBUCHSTABEN NICHT KURSIV	BLE
fusionierte DNA-Sequenzen	Verbunden durch Doppelpunkt	<sup>Sh</sup> ble:COP3
Fusionsproteine	Verbunden durch Doppelpunkt	BLE:YFP
Codon-optimierte Sequenzen	<i>Spezies Initialen tiefgestellt kursiv</i>	<sub>c</sub> ble
Übergang Promotor zu Gen	zwei Doppelpunkte	PsaD:: <sup>Sh</sup> ble:yfp

Nach Möglichkeit wird ein identischer Dreibuchstabencode in Großbuchstaben für das Gen und die codierte Proteinsequenz verwendet. Das Gen wird dabei kursiv geschrieben. Des Weiteren werden heterologe Gene in Kleinbuchstaben kursiv angegeben mit hochgestellten kursiven Initialen der Spezies. Zur Unterscheidung codon-optimierter Sequenzen werden die Initialen des Organismus kursiv tiefgestellt angegeben. Allgemein wird auf Ebene der Proteine auf die Angabe der Initialen verzichtet, außer es handelt sich um homologe Proteine aus verschiedenen Organismen z.B: <sup>At</sup>PHOT und <sup>Cr</sup>PHOT. Fusionierte DNA- oder Proteinsequenzen werden durch einen Doppelpunkt gekennzeichnet. Der Übergang einer Promotorsequenz zur codierenden Sequenz wird durch zwei Doppelpunkte angegeben.

Traditionell gibt es dabei auch Ausnahmen. So werden die beiden Kanalrhodopsin-Proteine als ChR1 und ChR2 angegeben und die korrespondierenden Gene als *COP3* und *COP4*.



## Abkürzungsverzeichnis

IFT	Intraflagellarer Transport
NPQ	Nicht-photochemisches Quenching
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
mt	mating type
LOV	Light, Qxygen and Voltage
FMN	Flavin-Mononukleotid
BL	Blaues Licht
$\tau_{1/2}$	Halbwertszeit
HKR	Histidinekinase-Rhodopsin
pCRY	plant Cryptochrome
aCRY	animal Cryptochrome
PHOT	Phototropin
Gene ID	Gen-Identifikationsnummer
CAF	Chromatin Assembly Factor
CAC	Chromatin Assembly Complex
NHEJ	nicht-homologe-Endverknüpfung
DSB	Doppelstrangbruch
diRNA	Doppelstrangbruch induzierte RNA
DSBR	Doppelstrangbruch-Reparatur
dHJ	doppelte Holliday-Struktur
SDSA	Synthesis-Dependent Strand Annealing
HR	homologe Rekombination
DNA-PKcs	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit
InDels	Insertionen oder Deletion
FokI	DNA-Restriktionsdomäne
B2H	Bakterien-Zwei-Hybrid-System
CoDA	Context dependent assembly
OPEN	Oligomerized Pool Engineering
GFP	grün fluoreszierendes Protein
TALENs	Transcription activator-like Effector Nucleases
TAL	Transcription activator-like
RVD	repeat variable diresidue
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeats
tracrRNA	trans-activating CRISPR-RNA
PAM	protospacer adjacent motif
NLS	Kernlokalisationssequenz
IM	Insertions-Mutagenese
TILLING	Targeting induced local lesions in genomes
RNAi	RNA-Interferenz
dsRNA	doppelsträngigen RNA

ssRNA	einzelsträngigen RNA
RISC	RNA induced silencing complex
PCR	Polymerase Kettenreaktion
ssODN	einzelsträngige Desoxynukleotide
Rep	Replication-Initiator-Protein

## **Vorwort**

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit zwischen August 2008 und Oktober 2014 am Institut für Biologie der Humboldt-Universität zu Berlin in der Arbeitsgruppe Experimentelle Biophysik unter der Anleitung von Prof. Peter Hegemann.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

*The Plant Journal* (2013) 73, 873–882

**Nuclear gene targeting in *Chlamydomonas* using engineered zinc-finger nucleases**

Irina Sizova <sup>†</sup>, **Andre Greiner** <sup>†</sup>, Mayanka Awasthi, Suneel Kateriya and Peter Hegemann

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work.

*The Plant Cell* November 2012 vol. 24 no. 11 4687-4702

**Phototropin Influence on Eyespot Development and Regulation of Phototactic Behavior in *Chlamydomonas reinhardtii*.**

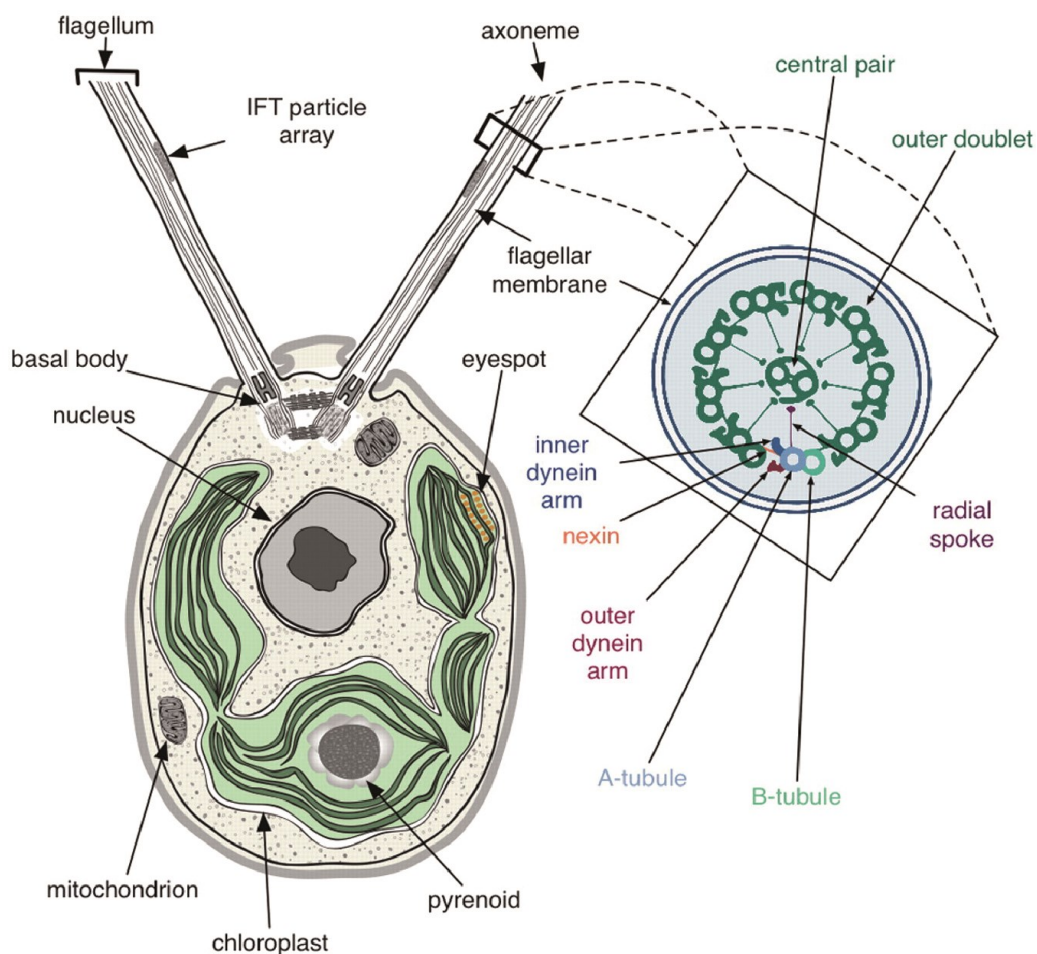
Jessica Trippens,<sup>1</sup> **Andre Greiner**,<sup>1</sup> Jana Schellwat, Martin Neukam, Theresa Rottmann, Yinghong Lu, Suneel Kateriya, Peter Hegemann, and Georg Kreimer

<sup>1</sup>These authors contributed equally to this work.

# 1. Einleitung

Diese Dissertation greift verschiedene Themenbereiche bezüglich „Die gezielte Genstilllegung in *Chlamydomonas reinhardtii*“ auf. Zu Beginn erfolgt eine Einführung in die behandelten Themengebiete. Das Hauptaugenmerk liegt hierbei auf den Techniken zur gezielten Genstilllegung der Photorezeptorproteine in *Chlamydomonas reinhardtii*.

## 1.1 Der Modellorganismus *Chlamydomonas reinhardtii*



**Abbildung 1 Illustration einer *Chlamydomonas* Zelle**

Schematische Darstellung einer *C. reinhardtii*-Zelle im Querschnitt (links) und Aufbau einer Flagelle (rechts). Der becherförmige Chloroplast füllt die Zelle beinahe komplett aus. Innerhalb des Chloroplasts befindet sich der Pyrenoid. Er ist ein spezielles Organ zur Anreicherung von CO<sub>2</sub> unter Ausschluss von Sauerstoff und beinhaltet hauptsächlich RuBisCo. Ebenfalls Bestandteil des Chloroplasts ist der Augenfleck, welcher der phototaktischen Orientierung dient. Mittig innerhalb der Zelle befindet sich der Zellkern, welcher das haploide Genom beinhaltet. Apikal befinden sich als Ausgangspunkte für die beiden Flagellen die Basalkörper. Während der Zellteilung wird die Flagelle resorbiert, die Basalkörper dienen dann als Zentriolen dem Aufbau des Spindelapparates und der Segregation der Chromosomen. *Chlamydomonas* besitzt zwei Flagellen zur Fortbewegung und Paarung. Der Mechanismus des intraflagellaren Transportes (IFT) erlaubt den anterograden und retrograden Transport von Proteinen innerhalb der Flagellen. Aus: (Merchant et al., 2007)

*Chlamydomonas* ist ein beliebtes Forschungsobjekt in verschiedenen Bereichen der Pflanzenforschung, da - verglichen mit höheren Pflanzen - die schnelle Teilungsrate rasche Ergebnisse experimenteller Ansätze ermöglicht. Diese Eigenschaft führte auch zur Bezeichnung „Green Yeast“ für *Chlamydomonas* (Rochaix, 1995) in Anlehnung an Hefen, welche aufgrund ihrer einfachen Handhabung und schnellen Generationszeit ebenfalls eine große Bedeutung als Modellorganismus erlangt haben.

**Der Chloroplast** ermöglicht der Zelle, Photosynthese zu betreiben, wodurch mit Hilfe des Sonnenlichtes aus Wasser und Kohlenstoffdioxid organische Zuckerverbindungen hergestellt werden, welche wiederum zu komplexeren Verbindungen metabolisiert werden können. Dies nennt man photoautotrophes Wachstum, welches der Alge erlaubt, sich auch in nährstoffarmer Umgebung zu vermehren. Aufgrund der einfachen Handhabung, der erfolgten Sequenzierung des chloroplastidiären Genoms und den vorhandenen Methoden zur genetischen Veränderung ist *Chlamydomonas* ein beliebtes Modellsystem der Photosyntheseforschung.

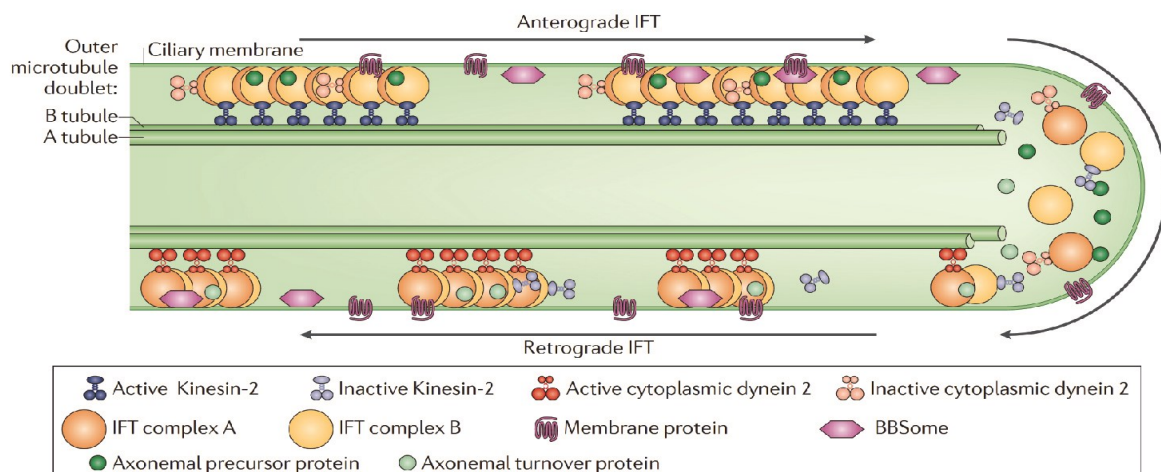
Eines dieser Gebiete der Photosyntheseforschung in *Chlamydomonas* ist die „nicht-photochemische Löschung bzw. das Quenching (NPQ)“ überschüssiger Lichtenergie durch Dissipation von Wärme. Bei hohen Lichtintensitäten überschreitet die Menge an Energie, welche durch das Chlorophyll absorbiert wird, die metabolische Aufnahmekapazität der Chloroplasten. Das NPQ verhindert eine Schädigung des Photosyntheseapparates durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS), welche bei der Reaktion von Chlorophyll mit O<sub>2</sub> entstehen kann. Das LHCSR3 Protein, welches in Algen für das NPQ verantwortlich ist, gehört zur Familie der LHC-ähnlichen Proteine. LHCSR3 wird bei hohen Lichtintensitäten vermehrt exprimiert und die Menge wird entsprechend der Umweltbedingungen angepasst (Bonente et al., 2011).

**Die Flagellen** ermöglichen der Zelle in Bereiche mit geeigneten Lichtbedingungen zu gelangen, um dort Photosynthese zu betreiben. *Chlamydomonas* dient als Modellorganismus dazu, die Funktion von Flagellen zu untersuchen, auch weil diese homolog zu Cilien aus Eukaryoten sind. Die Einfachheit der Isolation von Flagellen aus *C. reinhardtii* ermöglichen sowohl eine biochemische Analyse als auch die nachfolgende Untersuchung der Ultrastruktur mittels Elektronenmikroskopie (Weiss et al., 1977). Wie in Abbildung 1 zu sehen, zeigt der Querschnitt einer Flagelle einen speziellen Aufbau von polymerisiertem Tubulin ( $\alpha$ -Tubulin und  $\beta$ -Tubulin) in der sogenannten 9x2+2 Konfiguration. Diese Struktur wird als Axonem bezeichnet. An den äußeren doppelten Mikrotubuli (9x2) befinden sich in regelmäßigen Abständen zwei Dyneine, welche maßgeblich für die Bewegung der Flagellen verantwortlich sind. Sie bewegen sich entlang

des benachbarten Mikrotubuli und verursachen ein aneinander Gleiten der Strukturen. Die zentralen Mikrotubuli sind mit den äußeren Paaren über die Speichenproteine verbunden.

Auch der Mechanismus des intraflagellaren Transportes (IFT) (Kozminski et al., 1993) wurde zuerst in *Chlamydomonas* entdeckt und beschrieben. Es gibt zweierlei Arten von IFT. Der anterograde IFT dient dazu die am Aufbau der Flagelle beteiligten Proteine von der Basis der Flagelle zur Spitze zu transportieren. Die sogenannten „IFT-trains“ sind Multiproteinkomplexe, die sich entlang des Axonems bewegen. Das dafür verantwortliche Motorprotein ist das Kinesin-2 (Pedersen et al., 2006).

Der retrograde IFT dient während der Resorption der Flagellen dazu, die Proteine wieder zum Zellkörper zu transportieren. Außerdem werden beschädigte oder nicht mehr benötigte Proteine abtransportiert, um im Zellkörper wiederverwertet zu werden (Abbildung 2). Auch für den retrograden Transport ist ein spezielles Motorprotein verantwortlich, das zytoplasmatische Dynein-2 (Ishikawa and Marshall, 2011).



**Abbildung 2** Intraflagellare Transportprozesse

(A) Darstellung der Intraflagellaren Transportmaschiene (IFT). Das für den anterograden Transport zuständige Motorprotein ist das heterotrimere Kinesin-2. Es transportiert die IFT-Komplexe A und B, Proteine des Axonems und Zytoplasmatisches-Dynein-2 an die Flagellenspitze. Während dieser anterograden Bewegung ist Kinesin-1 aktiv und das retrograde Motorprotein Zytoplasmatisches-Dynein-2 bleibt inaktiv. An der Spitze angekommen, werden die axonemalen Proteine freigesetzt und es findet eine Umordnung der IFT-„Züge“ statt. Dies führt zur Aktivierung des Zytoplasmatisches-Dynein-2, welches nun die IFT-Komplexe zurück zum Zellkörper transportiert. Auch Membranproteine und das BBSome (Bardet-Biedl-Syndrom Proteine) werden durch den IFT transportiert. Aus: (Ishikawa and Marshall, 2011)

### 1.1.1 Der Augenfleck und die Kanalrhodopsine

Eines der augenscheinlichsten Merkmale bei den Arbeiten mit *Chlamydomonas* ist die Fähigkeit der Alge sich am Licht zu orientieren. Je nach Lichtintensität und Farbe kommt es hierbei zu einer phototaktischen Reaktion. Mittels der beiden Flagellen ist es der Alge möglich, sich im Brustschwimmstil fortzubewegen, wobei sie mit 2 Hz um die longitudinale Achse rotiert (Nultsch, 1983). Da diese Bewegung gerichtet sein muss, um in Bereiche mit geeigneten Lichtintensitäten zu gelangen, besitzt sie einen Sehapparat, welcher als Augenfleck bezeichnet wird. Der Augenfleck befindet sich an der äquatorialen Ebene des Zellkörpers und ist mikroskopisch gut als orangener Fleck zu erkennen. Die Färbung entsteht durch eine zweischichtige Einlagerung von Karotenoid in Vesikeln, welches dazu dient das einfallende Sonnenlicht zu reflektieren (Abbildung 3 A) (Foster and Smyth, 1980).

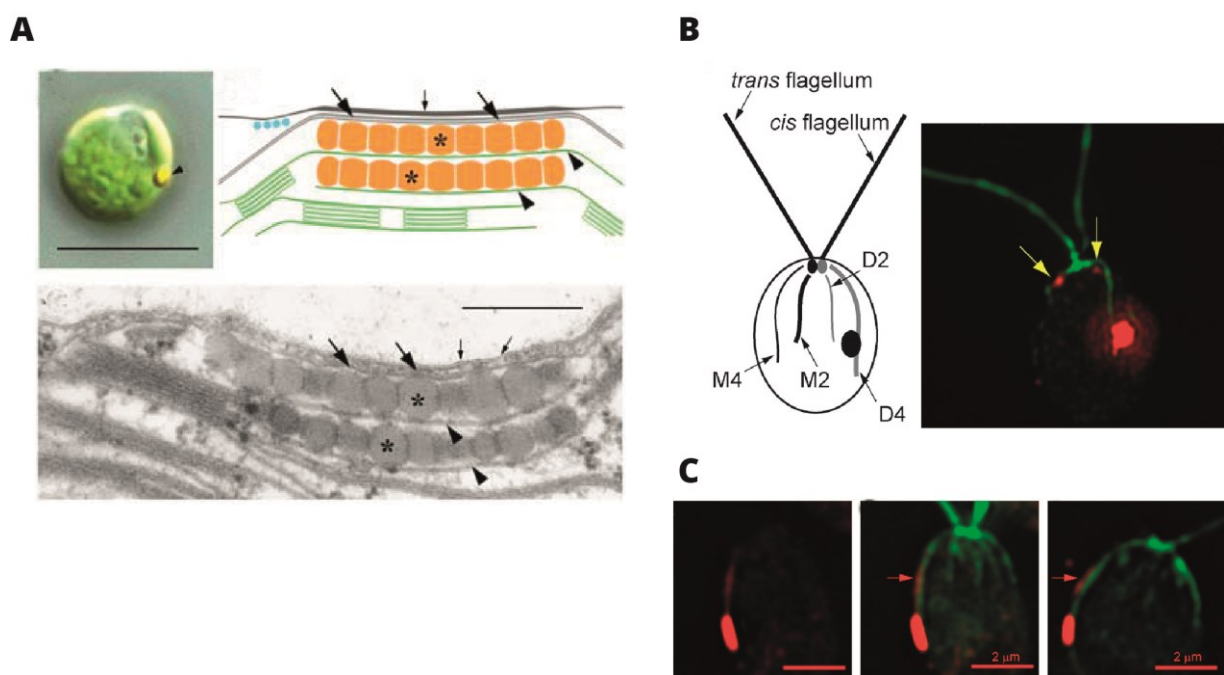
Die für die phototaktische Orientierung verantwortlichen Photorezeptoren waren lange Zeit nicht bekannt. Es wurde jedoch schon früh vermutet, dass es sich in *Chlamydomonas* um ein Rhodopsin mit einem Retinal als Chromophor handeln könnte (Foster and Smyth, 1980). Dies ging aus dem Aktionsspektrum des phototaktischen Verhaltens der Alge hervor. Foster et al. konnte schließlich 1984 anhand einer „blinden“ *Chlamydomonas*-Mutante zeigen, dass durch die Zugabe von Retinal-Analoga die phototaktische Orientierung wieder hergestellt werden kann und ein Retinal als Chromophor dient (Foster et al., 1984). Elektrophysiologische Messungen ergaben zudem, dass der lichtinduzierbare Photostrom hauptsächlich durch Calcium getragen wird. Ein erstes elektrisches Signal kann hierbei am Augenfleck (Photorezeptorstrom) detektiert werden, gefolgt von einem zweiten Signal an den Flagellen (Flagellenstrom). Bereits 500 µs nach der Applikation eines Lichtblitzes kann der Photorezeptorstrom gemessen werden. Dies machte eine Signalkaskade durch sekundäre Signalmoleküle unwahrscheinlich, da solche Prozesse für gewöhnlich langsamer ablaufen. Diese Ergebnisse ließen zum ersten Mal den Schluss zu, dass es sich bei dem gesuchten Photorezeptor um einen direkt lichtgesteuerten Ionenkanal handeln könnte (Harz, 1991; Braun and Hegemann, 1999).

Zehn Jahre später konnte Suneel Kateriya im Rahmen seiner Dissertation bei Prof. Peter Hegemann zeigen, dass es sich bei dem gesuchten Photorezeptor in Wahrheit um zwei verwandte, jedoch unterschiedliche Gene handelt. Die verantwortlichen Photorezeptoren sind Membranproteine und wurden Kanalrhodopsin-1 und -2 (ChR1 und ChR2) genannt (Nagel et al., 2002; Nagel et al., 2003). Anhand der nun bekannten Gensequenzen konnten die transmembranen Domänen in Oocyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis* heterolog exprimiert werden, um daran elektrophysiologische Messungen durchzuführen (Nagel et al., 2003).

---



Lichtaktivierte Ionenkanäle waren zu dieser Zeit noch nicht bekannt und die ersten, welche in der Literatur beschrieben wurden, sind die Kanalrhodopsine aus *Chlamydomonas*. Anhand zahlreicher elektrophysiologischer Studien zur Charakterisierung der Kanalrhodopsine konnte gezeigt werden, dass ChR1 und ChR2 ein beinahe gleiches Absorptionsspektrum besitzen. Die Absorptionsmaxima liegen hierbei bei etwa 475 nm und 500 nm. Eine Verschiebung der Absorptionsmaxima ist lediglich unter veränderten pH-Werten bei ChR1 zu beobachten (Kianianmomeni et al., 2009; Tsunoda and Hegemann, 2009). Die Ionenselektivität beider Kanäle unterscheidet sich nur unwesentlich. Beide leiten die monovalenten Kationen  $H^+$ ,  $Na^+$  und  $K^+$  sowie die divalenten Kationen  $Ca^{2+}$  und  $Mg^{2+}$  (Schneider et al., 2013).



**Abbildung 3** Der Augenfleck und Kanalrhodopsin-1

(A) Eine *Chlamydomonas*-Zelle, der Pfeil markiert den orange gefärbten Augenfleck. Daneben: Illustration eines Augenflecks. Die Karotinoid-Vesikle sind orange abgebildet. Die Lokalisation innerhalb des Chloroplasts und die Assoziation mit der Thylakoidmembran sind ebenfalls dargestellt. Unten: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Augenflecks. Aus: (Schmidt et al., 2006). (B) Schematische Darstellung einer *Chlamydomonas*-Zelle. Dargestellt sind die Position der vier Rootlets (M2, M4, D2, D4) sowie die Positionierung des Augenflecks am D4-Rootlet. Die gelben Pfeile zeigen die Lokalisation von Kanalrhodopsin-1 (ChR1) unterhalb der Basalkörper. Rechts und Unten: Immunofluoreszenz-Aufnahme. Rot: Anti-ChR1; Grün: Anti-acetyliertes Tubulin. (C) ChR1 (rot) kann im Augenfleck und entlang des D4-Rootlets lokalisiert werden.

Eine durch Interferenz-RNA (RNAi) induzierte Reduktion an ChR1 in vegetativen Zellen des Stammes CW2 hat eine starke Beeinträchtigung des phototaktischen Verhaltens zur Folge. In Gameten, in denen nur eine sehr geringe Menge an ChR2 nachgewiesen werden konnte, kam es bei der Reduzierung von ChR1 zum völligen Verlust der Phototaxis. Anhand spezifischer Antikörper gegen Kanalrhodopsin-1 konnte auch die vermutete Lokalisation im Augenfleck bestätigt werden (Berthold et al., 2008). Weitere Lokalisationsstudien ergaben, dass ChR1 entlang des D4-Rootlets zum Augenfleck transportiert wird (Abbildung 3). Auch punktuelle Signale in der

Nähe der Basalkörper konnten detektiert werden. Ob es sich dabei um eine Art Reservoir für den Transport der Kanalrhodopsine zum Augenfleck handelt oder eine Verbindung zur Entstehung des Flagellenstroms besteht, konnte bisher nicht abschließend geklärt werden (Abbildung 3 B+C) (Mittelmeier et al., 2011). Ein weiterer wichtiger Schritt zur Aufklärung des Aufbaus und der Funktion des Augenflecks war die massenspektrometrische Bestimmung des Augenfleck Proteoms. Hierbei konnten neben ChR1 und ChR2 auch die beiden durch alternatives Spleißen der mRNA entstandenen Produkte des Chlamyopsin-1 Genes, *COP1* und *COP2* (siehe Kapitel 1.1.3) nachgewiesen werden. Außerdem wurde Phototropin gefunden, welches im nächsten Kapitel behandelt wird (Schmidt et al., 2006).

### 1.1.2 Phototropin und der Lebenszyklus

In höheren Pflanzen wie *A. thaliana* beginnen mit dem Sonnenaufgang physiologische Veränderungen, um sich optimal an die Lichtverhältnisse anzupassen: Das Hypocotyl biegt sich in Richtung des einfallenden Sonnenlichtes und die Spaltöffnungen schließen sich zur Reduzierung des Wasserverlustes. Um bei hohen Lichtintensitäten eine Schädigung der Chloroplasten zu vermeiden, ordnen sich diese am Rande der Zelle in Stapeln an und meiden so die lichtexponierte Oberfläche der Zellen. Diese physiologischen Anpassungen in *A. thaliana* an die Lichtverhältnisse werden von einem Photorezeptor reguliert, dem sogenannten Phototropin. Das Genom von *A. thaliana* enthält zwei Phototropin-Allele, Phot1 und Phot2.

Im Gegensatz zu *A. thaliana*, besitzt *C. reinhardtii* nur ein Phototropin-Gen (*<sup>Cr</sup>PHOT*). Überraschenderweise kann ein Verlust von Phot1 und Phot2 in *Arabidopsis* teilweise funktional durch *<sup>Cr</sup>PHOT* komplementiert werden (Onodera et al., 2005). Daher ist es wahrscheinlich, dass ein gemeinsamer bisher unbekannter Regulationsmechanismus besteht, auch wenn die physiologischen Antworten sehr unterschiedlich ausfallen.

Ebenso wie *Arabidopsis* benutzen die *Chlamydomonas*-Zellen das Sonnenlicht um Energie zu speichern. Mit beginnendem Sonnenuntergang bereiten sie sich auf die ungeschlechtliche Zellteilung vor. Abhängig davon, wieviel Energie den Tag über gespeichert werden konnte, erfolgt in vegetativen Zellen eine aufeinanderfolgende mitotische Teilung in 2, 4, 8 oder sogar 16 Tochterzellen (Abbildung 4 A). In *Chlamydomonas* kommt es dabei zu mehreren hintereinander ablaufenden S/M-Phasen. Die Zellkernmembran bleibt dabei intakt und wird nicht abgebaut. Verschlechtern sich die Wachstumsbedingungen für *Chlamydomonas* wird dies anhand der sinkenden Konzentration an Stickstoff im umgebenden Medium registriert. Das Fehlen von Stickstoff löst die sogenannte Gametogenese aus. Die Gametogenese ist der erste Schritt im sexuellen Lebenszyklus von *C. reinhardtii*. Das Geschlecht einer jeden Zelle ist genetisch vorbestimmt (mt+ oder mt-; mt = mating type). In Abwesenheit von Licht entwickeln sich die Zellen zuerst zu sogenannten, noch nicht paarungsfähigen, Pre-Gameten. Werden diese anschließend mit Blaulicht bestrahlt, kommt es zur Aktivierung von Phototropin, wodurch die weitere Reifung zu paarungskompetenten Gameten ausgelöst wird (Huang and Beck, 2003). Gameten unterschiedlichen Geschlechts können mit Hilfe ihrer Flagellen einander anhaften, woraufhin die Zellen fusionieren. Es entwickelt sich eine unbegeißelte Zygote, welche die diploide Dauerform des Lebenszyklus darstellt. Geschützt durch eine dicke Zellwand ruhen die Zellen, bis sich die Umweltbedingungen wieder verbessert haben. Geschieht dies, teilen sich die Zygoten wieder in haploide vegetative Zellen und der Lebenszyklus beginnt von neuem.

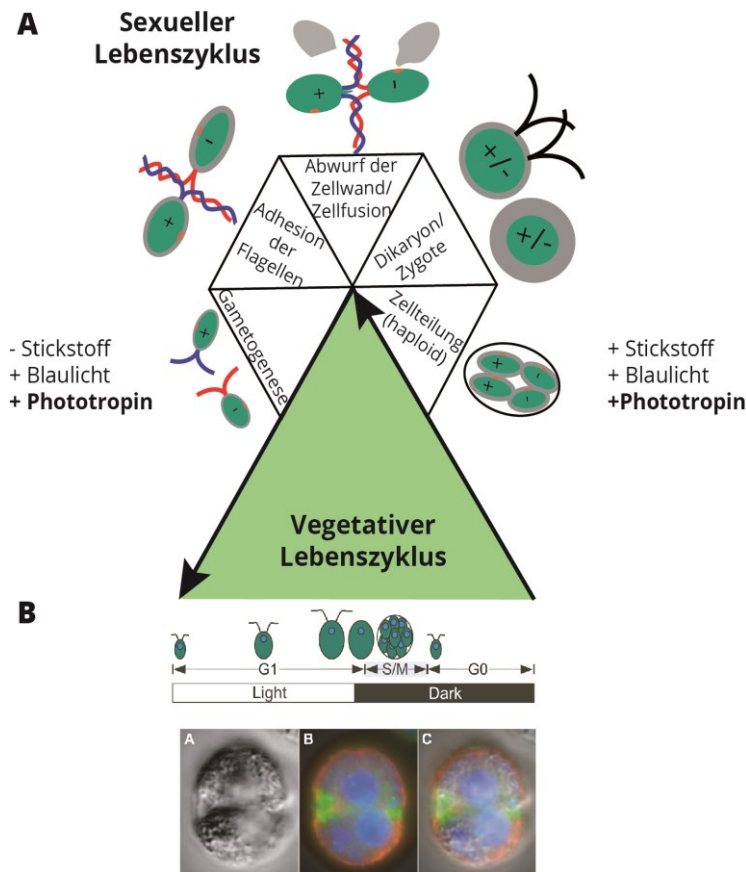


Abbildung 4 Der Lebenszyklus und Phototropin

(A) Unter Stickstoffmangel und Blaulicht wird der sexuelle Lebenszyklus eingeleitet. Gameten unterschiedlicher Mating-Typen adherieren an den Flagellen, um schließlich zu einer diploiden Zygote zu fusionieren. Durch Belichtung und Zugabe von Stickstoff wird die Zellteilung in haploide vegetative Zellen eingeleitet. (B) Im vegetativen Lebenszyklus von *C. reinhardtii* kommt es in Abhängigkeit von der Zellgröße zu mehreren aufeinanderfolgenden Zellteilungen. In *Chlamydomonas* kommt es dabei zu mehreren hintereinander ablaufenden S/M-Phasen. Die Zellkernmembran bleibt dabei intakt und wird nicht abgebaut. Grün: Proteine der Teilungsfurche; Blau (DAPI); Zellkern; Rot:  $\alpha$ -Tubulin. Entnommen und geändert aus (Wood et al., 2012).

Betrachtet man die Domänen-Struktur des Phototropins, so besteht sie aus zwei funktionalen Einheiten. N-terminal befindet sich die Photorezeptordomäne, welche auch als Regulator-domäne bezeichnet wird und aus zwei homologen LOV (Light, Oxygen and Voltage)-Domänen besteht. C-Terminal folgt eine Kinasedomäne, welche zur Familie der AGC-Kinasen (Proteinkinase A, G und C) gehört und für die Signalweiterleitung zuständig (Abbildung 4) (Huala et al., 1997). Durch Lichtaktivierung kann sich die Kinase- von der Photorezeptordomäne lösen und durch Phosphorylierung von Substraten eine Signalweiterleitung bewirken.

Jede LOV-Domäne enthält als Chromophor ein Flavin-Mononukleotid (FMN). Im Grundzustand des FMNs (D450) führt die Belichtung mit blauem Licht (BL) zu einem Signalzustand mit kovalenten Bindung zwischen Seitenkette eines konservierten Cysteins und dem C4-Atom des Flavins ( $^1$ PHOT: LOV1-Cys57 und LOV2-Cys250). Durch die Anregung erfolgt der Übergang in den Triplett-Zustand (L660) welcher zur Adduktbildung (S390) führt. Abhängig von der untersuchten LOV-Domäne kehrt diese erst nach Sekunden oder Minuten vom Signalzustand S390 zurück in

den Grundzustand D450 und der Photozyklus beginnt erneut (Swartz et al., 2001). Eine der interessantesten Aspekte bezüglich der Beziehung von Struktur und Funktion ist, wie LOV1 und LOV2 die Kinaseaktivität regulieren. Nach NMR Untersuchungen an phot1 aus *Avena sativa* führt die Aktivierung durch Blaulicht zur Entfaltung einer  $\alpha$ -Helix, die J $\alpha$  genannt wird und sich im Anschluss an LOV2 befindet. Hierdurch kann die Kinasedomäne dissoziieren und aktiv werden (Abbildung 5)(Harper et al., 2003). Im Dunkelzustand interagiert J $\alpha$  mit einem  $\beta$ -Faltblatt, deutlich erkennbar anhand einer Kristallstruktur (Halavaty and Moffat, 2007).

Die Photozyklen von  $^{Cr}$ LOV1 und  $^{Cr}$ LOV2 wurden intensiv untersucht. Wie sich zeigte, beträgt die Halbwertszeit ( $\tau_{1/2}$ ) des photointermediates von LOV1 in aufgereinigtem Volllänge-Phototropin 54s (Okajima et al., 2014). Der Photozyklus von LOV2 hingegen läuft schneller ab mit  $\tau_{1/2}$  ~ 13s. Wird LOV1 entfernt, zeigt LOV2 einen veränderten Photozyklus. Hierbei können eine schnelle (91%,  $\tau_{1/2}$  ~5s) und eine langsamere (9%,  $\tau_{1/2}$  ~ 105s) Komponente gemessen werden. Die schnellere Hauptkomponente zeigt einen um das 2,5-fache beschleunigten Photozyklus. Wird im Volllänge-Protein der Photozyklus von LOV1, durch Mutation von Cys57 zu Ser. inhibiert, kann immer noch eine 2-fach schnellere Rückkehr von LOV2 in den Dunkelzustand gemessen werden ( $\tau_{1/2}$  = 10s). Dies bedeutet, dass alleine durch die Anwesenheit der LOV1-Domäne, welche nicht aktiviert werden muss, sich der Signalzustand von LOV2 um das Doppelte verlängert (Okajima et al., 2014). In derselben Studie konnte auch zum ersten Mal mittels Kleinwinkelröntgenstreuung ein Modell der Struktur des Volllänge- $^{Cr}$ PHOT Proteins erstellt werden.  $^{Cr}$ PHOT liegt als Monomer in Lösung vor und die Applikation von Blaulicht führte zu einer Streckung der Struktur um ~10 Å (Abbildung 5 B).

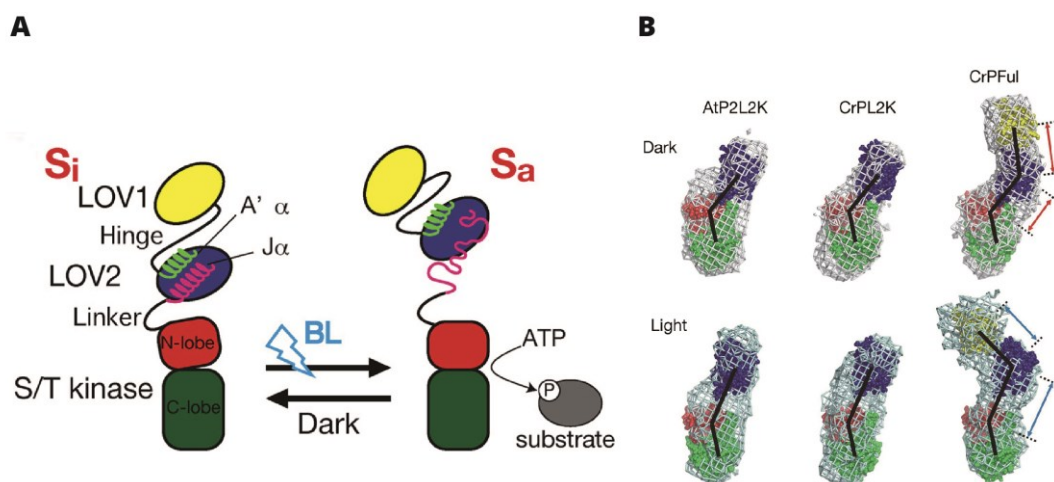


Abbildung 5 Phototropin Struktur

(A) Si – Signal Inaktiv; Sa – Signal aktiv. Durch Aktivierung mit blauem Licht entfaltet sich die J $\alpha$ -Helix. In Anwesenheit von ATP kann die freigesetzte Kinase durch Phosphorylierung von Substraten eine Signalweiterleitung bewirken. Ohne Belichtung kehrt Phototropin in den Ausgangszustand zurück. (B) Vergleich von niedrig aufgelösten molekularen Modellen im Licht- und Dunkelzustand. AtP2L2K (A. thaliana Phot2- LOV2:Kinase) und CrPL2K (C. reinhardtii PHOT – LOV2:Kinase) bzw. CrPFul (C. reinhardtii PHOT – Volllänge).

### 1.1.3 *Chlamydomonas*-Photorezeptoren

In diesem Abschnitt werden kurz die aus *Chlamydomonas* bekannten Photorezeptoren und deren intrazelluläre Lokalisation beschrieben, sowie eine Übersicht über die vorkommende Domänenstruktur (Abbildung 6 C) gegeben. In Abbildung 6 B sind alle Gene mit Angabe ihrer chromosomalen Position und Gen-Identifikationsnummer (Gene ID) tabellarisch aufgeführt.

**COP1** und **COP2** werden von einem Transkript codiert, welches anschließend alternativ gespleißt wird (Kateriya et al., 2004). COP1 und COP2 sind, wie die Nomenklatur nahe legt, die beiden ersten bekannten Rhodopsine aus *Chlamydomonas*. Sie sind nicht in höheren Pflanzen konserviert und besitzen nur vier transmembrane Helices anstatt der für membranständige Rhodopsine üblichen sieben. Es konnte nicht, wie anfangs vermutet, bestätigt werden, dass es sich hierbei um die für die Phototaxis verantwortlichen Rhodopsine handelt (Fuhrmann et al., 2001). COP2 liegt in einem Komplex mit YCF4, einem Thylakoidprotein, vor. (Ozawa et al., 2009). Die genaue Funktion ist allerdings immer noch unbekannt. Die Lokalisation im Augenfleck (Schmidt et al., 2006) und im Chloroplast (Abbildung 6 A), sowie das Fehlen von konservierten Domänen, lassen bisher keine Rückschlüsse über eine mögliche Funktion von COP1 und COP2 zu.

Die Kanalrhodopsine **ChR1 (COP3)** und **ChR2 (COP4)** wurden bereits in Kapitel 1.1.1 behandelt und werden daher hier nicht weiter beschrieben. Ihre Lokalisation beschränkt sich im Wesentlichen auf den Augenfleck. Ob es sich bei der Lokalisation an den Basalkörpern um Reservoirs für den Transport entlang des D4-Rootlets handelt, ist bisher nicht abschließend geklärt (Abbildung 6)

**COP5** (HKR1-Histidin-Kinase-Rhodopsin-1) bis **COP12** gehören zu einer neuen Klasse von Histidinkinase-Rhodopsinen, die aktuell genauer untersucht werden. Es handelt sich hierbei um modulare Proteine, bestehend aus einem Rhodopsin, einer Histidinkinase, einem „response regulator“ und meist einer Effektdomäne in Form einer Adenylylcyclase oder Ganylylcyclase (Abbildung 6). Da alle diese Domänen in einem Protein zusammengefasst sind, spricht man auch von einem „Zweikomponentensystem“, wie es vor allem aus Bakterien bekannt ist (Luck et al., 2012). Die spektroskopische Untersuchung der Rhodopsindomäne von COP5 ergab, dass es sich um eine schaltbare Sensordomäne handelt. Bei Belichtung mit UV-Licht (~380 nm) ändert sich die Absorption und es entsteht ein stabiler Zustand mit einem Absorptionsmaximum bei 490 nm. Die Absorption im UV-Bereich und die Lokalisation im Augenfleck könnten ein Hinweis darauf sein, dass COP5 für die Meidung schädlicher UV-Strahlung verantwortlich ist.

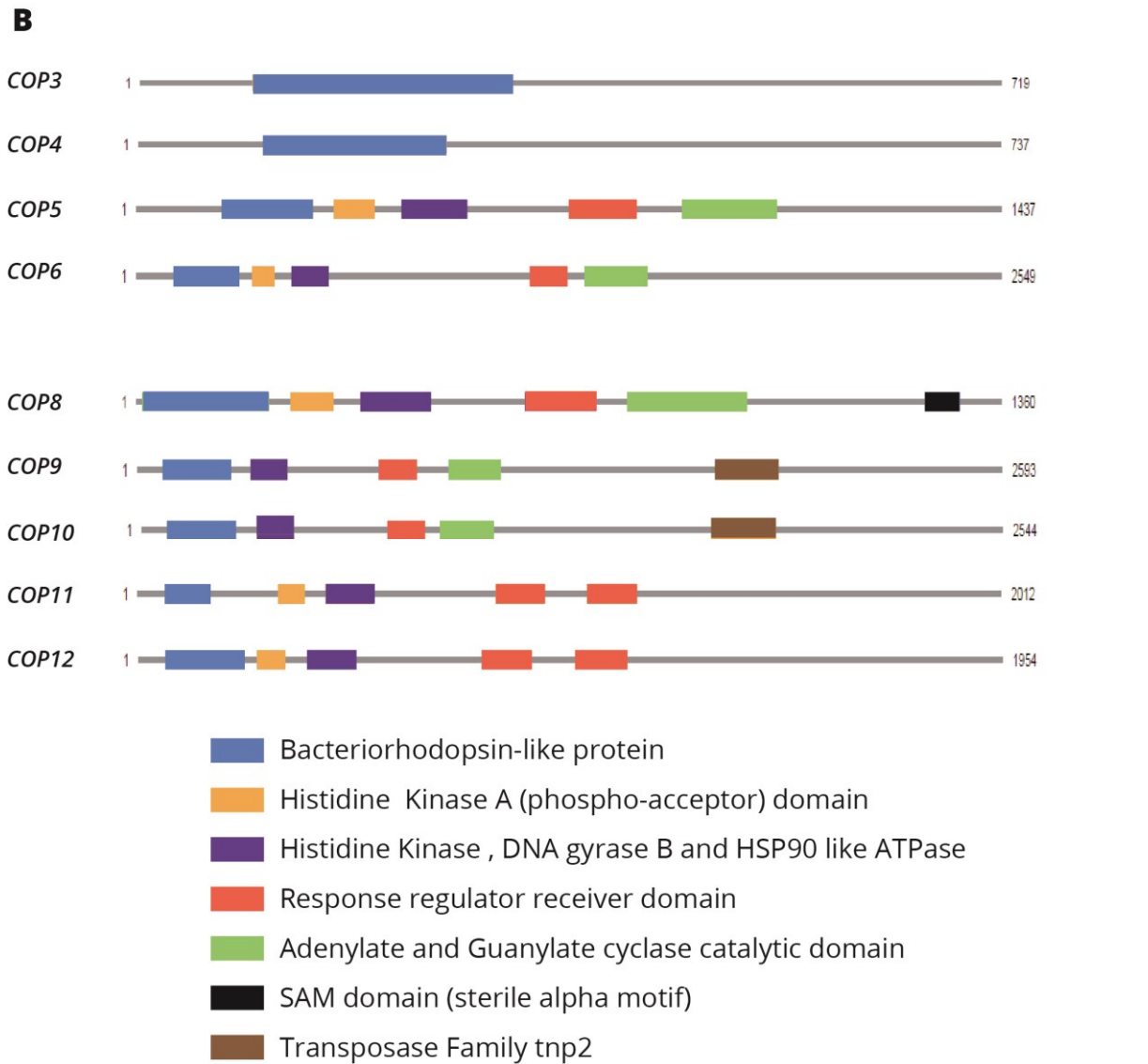
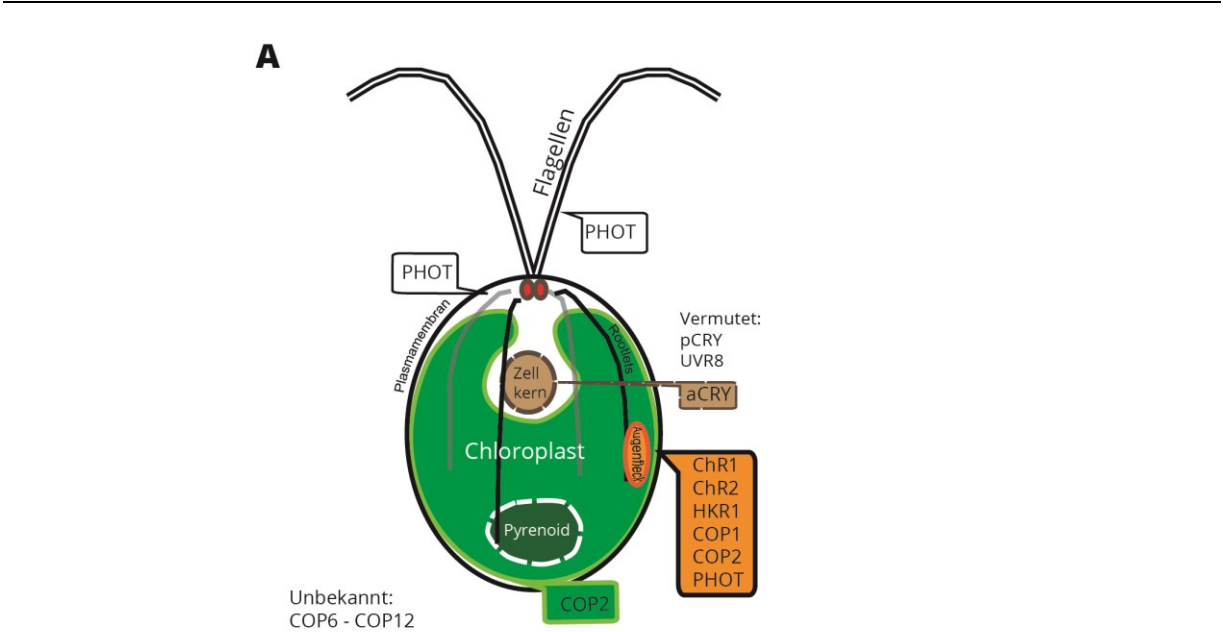
Über die weiteren Rhodopsine ist bisher nichts bekannt. *COP10* ist ein alternatives Spleißprodukt von *COP9* genauso wie *COP12* von *COP11*.

**PHOTOTROPIN** siehe Kapitel 1.1.2

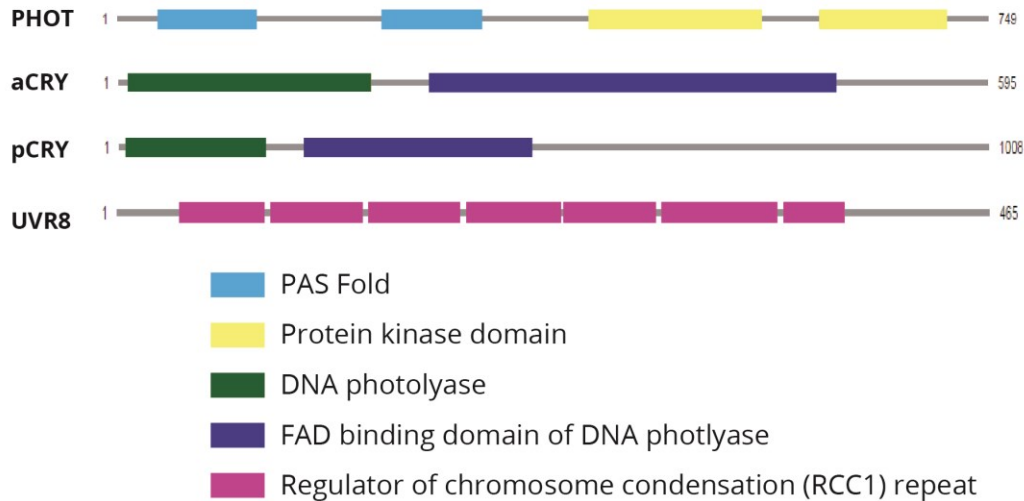
**CRYPTOCHROME** regulieren Wachstums- und Entwicklungsprozesse, sowie die circadiane Uhr in Pflanzen. Sie beeinflussen die Deetiolierung und kontrollieren in höheren Pflanzen die photoperiodische Blütenbildung (Ahmad et al., 1998; Guo et al., 1999). Außerdem wird die Schließzellendifferenzierung und -öffnung, das Wurzelwachstum, die Frucht- und Samengröße, das Stammwachstum und die Apikaldominanz beeinflusst (Prager, 2012).

Cryptochrome gehören zur größeren Klasse der Photolyasen (Abbildung 6) und fungieren als lichtinduzierte DNA-Reparaturenzyme. Cryptochrome kommen sowohl in Bakterien, Pilzen, Insekten als auch Pflanzen vor. In *Chlamydomonas* sind zwei Cryptochrome beschrieben, "plant Cryptochrome (pCRY)" und „animal Cryptochrome (aCRY)". aCRY löst eine Änderung der Genexpression durch Belichtung mit blauem, gelben oder rotem Licht aus. Die Absorption im gelben und roten Bereich des sichtbaren Lichtes ist bisher nur aus *Chlamydomonas* aCRY bekannt (Beel et al., 2012; Spexard et al., 2014).

**UVR8** kontrolliert die Expression von mehr als 100 Genen nach UV-B Bestrahlung in *A. thaliana*. Eine *uvr8*-Deletionsmutante zeigte erhöhte Sensitivität gegenüber UV-B Strahlung aufgrund einer reduzierten Expression von Genen, welche vor UV-Strahlung schützen. Die sieben RCC1-Domänen eines UVR8-Proteins bilden eine ringförmige Struktur, welche ohne Belichtung mit einem weiteren UVR8-Molekül hybridisiert (Abbildung 6). UVR8 akkumuliert als Monomer im Nukleus nach Lichtaktivierung und bindet an das Chromatin, dort interagiert es mit COP1 (constitutively photomorphogenic 1), um transkriptionale Antworten auszulösen (Christie et al., 2012).







**C**

Annotation	Gene ID	Chromosome Location
<b>COP1</b>	Cre01.g002500.t1.1	chromosome_1:441094..444942 reverse
<b>COP2</b>	Cre01.g002500.t1.2	
<b>COP3</b>	Cre14.g611300	chromosome_14:493380..500751 reverse
<b>COP4</b>	Cre02.g085257	chromosome_2:1623925..1631068 forward
<b>COP5 (HKR1)</b>	Cre02.g074150	chromosome_2:116286..126657 forward
<b>COP6</b>	Cre11.g467678	chromosome_11:1097316..1116834 forward
<b>COP7</b>	Cre01.g038050	chromosome_1:5408676..5421947 forward
<b>COP8</b>	Cre07.g329900	chromosome_7:2572303..2585347 forward
<b>COP9</b>	Cre15.g643503.t1.1	chromosome_15:1768428..1794551 forward
<b>COP10</b>	Cre15.g643503.t2.1	
<b>COP11</b>	Cre17.g733150.t1.1	chromosome_17:4615614..4631793 reverse
<b>COP12</b>	Cre17.g733150.t2.1	
<b>Phot</b>	Cre03.g199000	chromosome_3:8321420..8329663 reverse
<b>animal CRY</b>	Cre06.g278251	chromosome_6:4270533..4277604 forward
<b>plant CRY</b>	Cre06.g295200	chromosome_6:6837075..6843266 reverse
<b>UVR-8</b>	Cre05.g230600	chromosome_5:708635..714270 forward

**Abbildung 6** *Chlamydomonas* Photorezeptoren

(A) In dieser Illustration einer *C. reinhardtii*-Zelle sind die bisher bekannten Photorezeptoren und ihre intrazelluläre Lokalisation dargestellt. (B) Schematische Darstellung der Photorezeptoren. Darstellungen und Annotationen wurden aus „Phytozome 10“ entnommen. Gene IDs der abgebildeten Rezeptoren sind in (C) gelistet. (C) Angegeben sind die Gen-Identifikationsnummern (Gene ID; V5.5) aller aus *Chlamydomonas* bekannten Photorezeptoren und deren chromosomale Position.

## 1.2 Mechanismen zur Erhaltung der genetischen Information

Um die Funktion eines einzelnen Gens zu bestimmen, im vorliegenden Falle die eben vorgestellten Photorezeptor-Gene aus *C. reinhardtii*, ist es notwendig, dieses im Organismus zu deaktivieren. Aus diesem Grund wurden Techniken für eine gezielte Genstilllegung entwickelt. Im Idealfall kann unter Verwendung der zelleigenen DNA-Reparaturmechanismen ein einzelnes Gen gezielt verändert werden. Die im Folgenden erläuterten Techniken zur gezielten Genstilllegung beruhen darauf, dass innerhalb des Zielgenes ein DNA-Doppelstrangbruch verursacht wird. Abhängig vom DNA-Reparaturmechanismus können auf diese Weise verschiedene Arten der Genveränderung induziert werden. Infolgedessen werden zunächst die zugrunde liegenden Mechanismen der DNA-Reparatur und anschließend die verschiedenen Methoden der gezielten Genstilllegung erläutert.

### 1.2.1 Die Organisation des eukaryotischen Genoms

Die grundlegende strukturelle Untereinheit des Genoms ist das Nukleosom. Es besteht aus annähernd 150 bp DNA, die um ein Histone-Oktamer gewunden sind. Dieses Oktamer besteht wiederum aus je zwei Molekülen der Histone H2A, H2B, H3 und H4. Während der Duplikation des Genoms ist daher nicht nur eine Duplizierung der DNA, sondern auch eine Reorganisation der Histone auf der neu synthetisierten DNA erforderlich. Da Histone nicht selbst-organisierend an die DNA binden können, werden hierfür sogenannte Histone-Chaperone benötigt. Der „Chromatin Assembly Factor 1 (CAF-1)“ ist ein solches Histone-Chaperone. Im Zusammenspiel mit der DNA-Replikationsmaschinerie positioniert CAF-1 die Histone H3 und H4 auf den neu gebildeten DNA-Doppelsträngen. Dieser Vorgang ist der initiale Prozess, welcher zur Bildung des Chromatins führt. Auch während der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen fügt CAF-1 neue Nukleosomen an die DNA an. CAF-1 ist ein hochkonservierter heterotrimerer Komplex. In Hefen ist dieser als „Chromatin Assembly Complex (CAC)“ bekannt und besteht aus den drei Untereinheiten CAC1, CAC2 und CAC3. In Säugetieren wurden die Untereinheiten entsprechend ihrem Molekulargewicht benannt und heißen p150, p60 und p48. Auch in Pflanzen ist CAF-1 konserviert und wurde bereits in *Arabidopsis thaliana* untersucht, wobei die Untereinheiten FAS1, FAS2 und MIS3 genannt wurden (Abbildung 7).

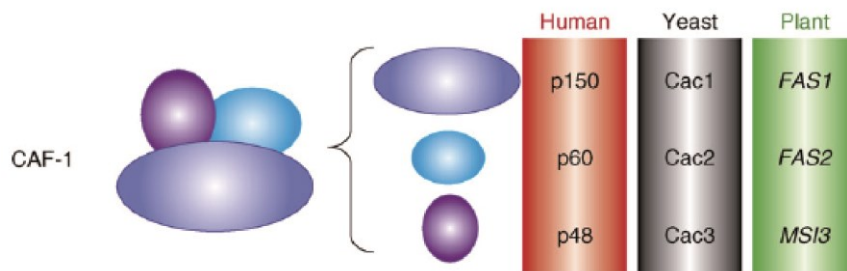


Abbildung 7 „Chromatin Assembly Factor 1“

CAF-1 Nomenklatur in Pflanzen, Hefen und Mensch

Ungeachtet ihrer evolutionären Konservierung unterscheiden sich die Merkmale einer CAF-1 Dysfunktion in einzelligen und mehrzelligen Organismen. In Säugetierzellen kann ein Verlust von funktionalem CAF-1 einen Stop der Zellteilung bewirken und zur Apoptose führen. Ein funktionaler Verlust von CAF-1 führt in Hefen zu einer verringerten Chromatinbildung. Auch in *A. thaliana* konnte gezeigt werden, dass *fas1* und *fas2* Mutanten eine verringerte Menge an Heterochromatin aufweisen, was auf eine notwendige Funktionalität des CAF-1 Komplexes für die Bildung von Heterochromatin hindeutet. Analysen des *A. thaliana* Transkriptoms zeigten, dass eine kleine Anzahl an Genen (< 2,1%) aufgrund einer CAF-1 Mutation entweder höher oder niedriger exprimiert wird. Die gefundenen Gene sind nicht gleichmäßig über die verschiedenen funktionalen Kategorien verteilt, sondern einzelne Gruppen zeigen vermehrt ein verändertes Expressionsmuster. Besonders Gene, die während der späten S-Phase des Zellzykluses aktiv sind und zur Kategorie der DNA-Reparatur Enzyme zählen, zeigen eine erhöhte Expression. Dazu gehören die Histone H3.1, H4 und H3.3, BRCA1 und RAD51 (Schönrock et al., 2006) und Gene, die verantwortlich sind für die Reparatur eines DNA-Doppelstrangbruches mittels homologer Rekombination. Das Expressionslevel der an der NHEJ (Nicht-homologe-Endverknüpfung; engl.: non-homologous end joining; NHEJ siehe 1.2.2.2) beteiligten Proteine bleibt hingegen unverändert (Ramirez-Parra and Gutierrez, 2007).

## 1.2.2 DNA-Doppelstrangbruch Reparatur

Die Stabilität unseres Genoms wird konstant durch exogene und endogene Faktoren gefährdet, was zu einer Veränderung der Basenpaarabfolge oder einem DNA-Doppelstrangbruch (DSB) führen kann. Auch während der Mitose werden durch Anhalten der Replikationsgabel DSB verursacht. Um diese und alle anderen Schädigungen der DNA zu detektieren, hat die Zelle ein Überwachungssystem entwickelt, welches ihr erlaubt, die verschiedenen Arten der DNA-

Schädigung zu erkennen und den dafür notwendigen Reparaturmechanismus zu aktivieren (Michalik et al., 2012). Diese Fähigkeit ist notwendig, um den Informationsgehalt des Genoms zu erhalten und dessen Integrität zu bewahren. Fehlerhafte Reparaturmechanismen können zu Mutationen und chromosomalen Umordnungen führen (Kass and Jasin, 2010).

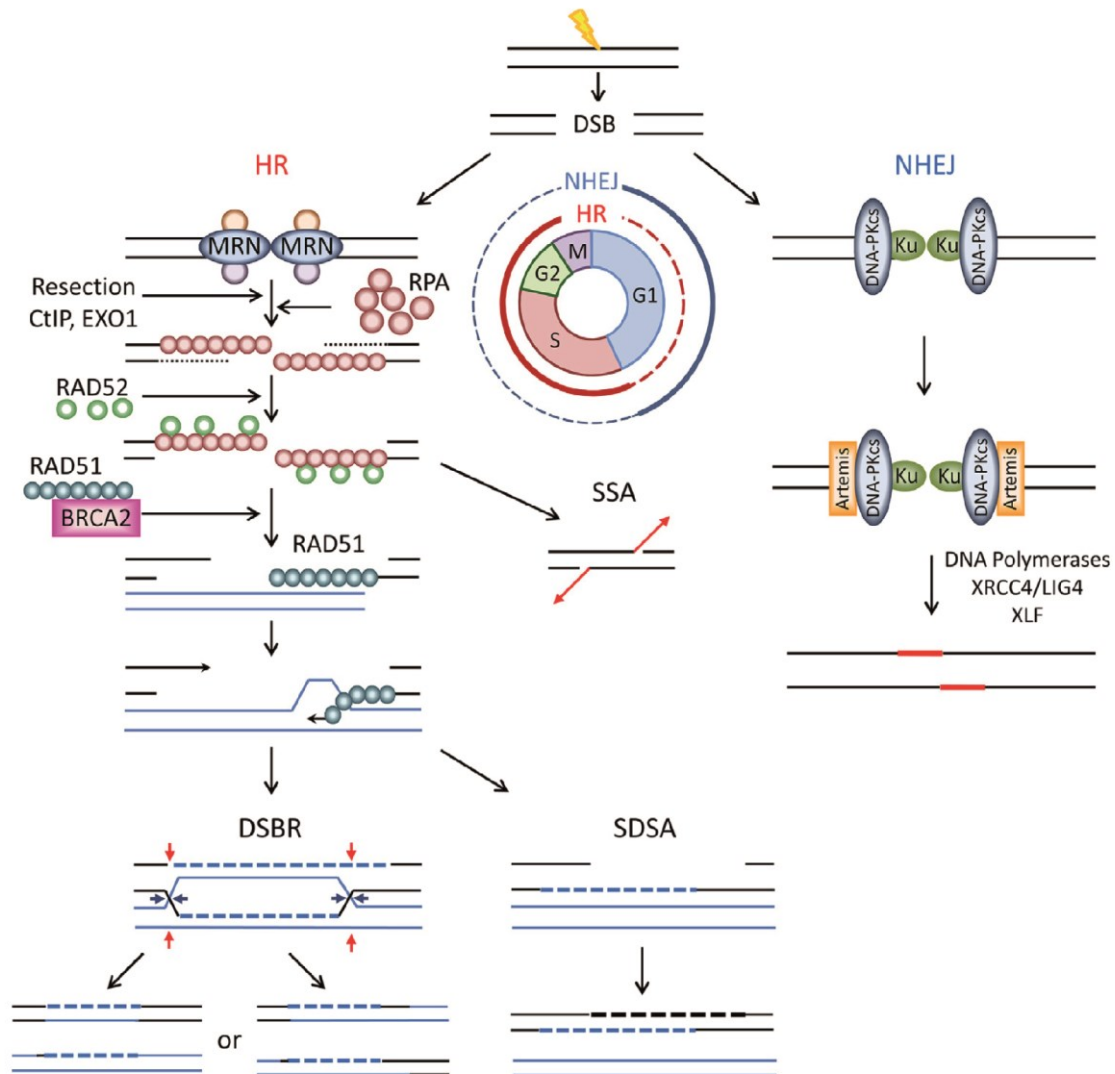


Abbildung 8 Übersicht der DNA-Doppelstrangbruch Reparaturmechanismen

HR ist aktiv in sich teilenden Zellen oder in der S/M-Phase, wohingegen NHEJ in sich teilenden und nicht-teilenden Zellen aktiv ist. Die Bildung des MRN-Komplexes initiiert die HR. Exonukleasen (CtIP oder Exo1) katalysieren die Bildung einzelsträngiger DNA durch Abbau der freien 5' Enden. Aus: (Iyama and Wilson, 2013)

Die beiden Hauptwege für die erfolgreiche Reparatur eines DSB sind die nicht-homologe Endverknüpfung (engl.: non-homologous end joining; NHEJ) und die homologe Rekombination (HR). Hierbei ist die NHEJ der primäre Mechanismus um einen DSB zu korrigieren, der nicht in Zusammenhang mit der DNA-Replikation steht. NHEJ tritt also hauptsächlich während der G1-

Phase des Zellzykluses auf, wohingegen die HR in der späten S-G2-Phase vorherrscht (Abbildung 8) (Misteli and Soutoglou, 2009).

### 1.2.2.1 Homologe Rekombination

Die Homologe Rekombination spielt während der DNA Replikation sowohl bei der Reparatur von DNA-DSB während der Mitose als auch beim Austausch genetischer Information während der Meiose eine wichtige Rolle. Für die Genstilllegung ist lediglich die Rolle der HR während der DNA-Reparatur entscheidend, welche nun näher aufgezeigt wird.

Das klassische Modell der HR beinhaltet folgende Schritte (San Filippo et al., 2008):

- a.) Initiation der HR durch einen DSB
- b.) Prozessierung der doppelsträngigen DNA zu Einzelsträngen mit freien 3' OH-Enden
- c.) Formation des Rekombinase-Filaments an den Enden der Einzelstrang-DNA
- d.) Detektion der homologen Sequenz auf dem Schwesterchromatid und Bildung des D-Loop Segmentes
- e.) Verwendung der homologen Sequenz als Matrize für die Verlängerung des freien 3' OH Endes
- f.) Einfangen des zweiten DSB-Endes durch Annealing am verlängerten D-Loop Segment
- g.) Reparatur des DSB

Der Mechanismus der HR wird hier anhand der Prozesse in eukaryotischen Zellen verdeutlicht. Viele der beschriebenen Schritte sind jedoch auch in Hefen konserviert und dort untersucht worden.

### 1.2.2.1.1 Prä-Synapsis

Die Initiation des DNA-Reparatur Komplexes der HR erfolgt in einer zeitlich und räumlich geordneten Form. Zuerst formiert sich der primäre Sensor Komplex MRN (MRE11-RAD50-NBS1), welcher die beschädigte DNA detektiert (Abbildung 8). Dieser Komplex ist entscheidend für die Rekrutierung der DDR-Kinase (DNA-Damage-Response) ATM, welche die Histone-H2AX der umgebenden Nukleosomen phosphoryliert. Phosphorylierte H2AX-Histone binden nun an das MDC1-Protein, welches als Plattform für die Chromatin-Restrukturierungsproteine (53BP1 und BRCA1) dient. Die Bindung dieser Proteine führt schließlich zur Rekrutierung von Nukleasen (CtIP, Exo1 Nukleasen), welche die Bildung eines DNA-Einzelstranges katalysieren. An die so entstandene ssDNA bindet das Replikationsprotein A (RPA) (Misteli and Soutoglou, 2009).

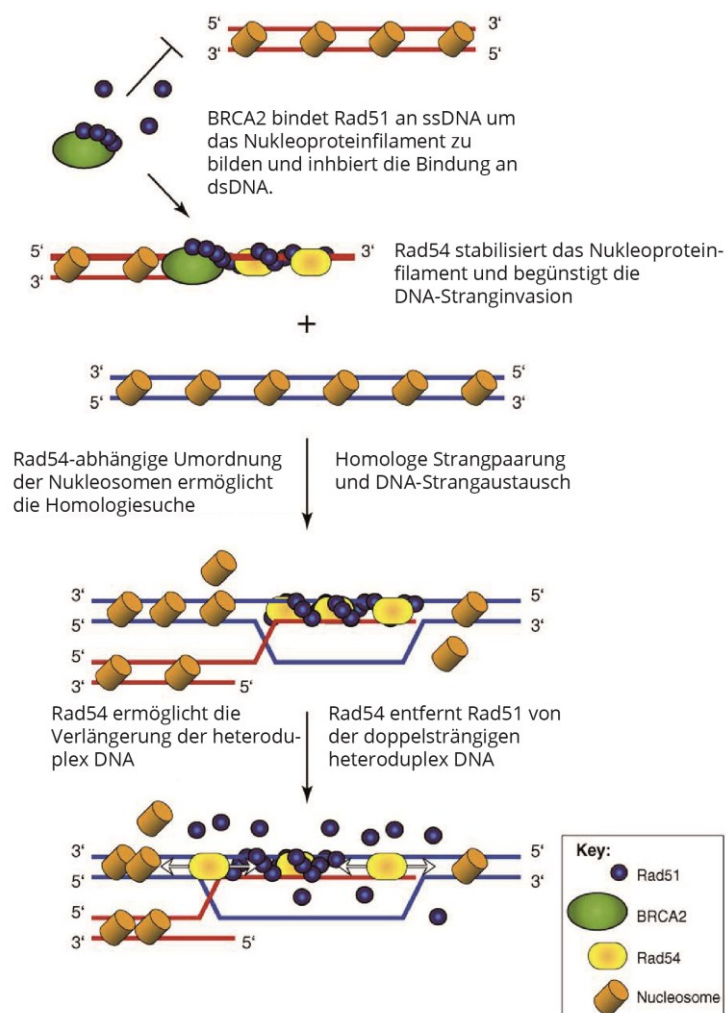


Abbildung 9 Die BRCA2 und Rad51 Proteine

Die BRC-Domänen des BRCA2 ermöglichen die Bindung von Rad51 an ssDNA. Das Rad51 Filament wird durch Rad54 stabilisiert. Rad54 remodeliert die nukleosomale DNA und erlaubt die Bindung des Filamentes an homologe DNA. Nach der homologen Paarung und DNA-Strangtausch ist Rad51 an doppelsträngiger heteroduplex DNA gebunden. Rad54 bewirkt die heteroduplex Verlängerung (engl.: Branch migration) und den Abbau des Rad51-Filamentes, womit weiteren prozessiven Enzymen, wie Polymerasen, der Zugang ermöglicht wird. Modifiziert aus (Forget and Kowalczykowski, 2010)

Die Enzyme, welche für die Paarung und den Austausch von DNA während der HR verantwortlich sind, werden Rekombinasen genannt. Sie vermitteln die Reaktion der homologen DNA-Paarung und des DNA-Strang austausches. Es existieren zwei Rekombinasen in eukaryotischen Zellen, Rad51 und Dmc1. Dmc1 ist nur während der Meiose aktiv und wird daher hier nicht näher beschrieben. Rad51 hingegen ist sowohl in der Meiose als auch in der Mitose aktiv. Wie auch für viele andere Enzyme der HR, wurden die meisten Rad51 Experimente in *S. cerevisiae* durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass rad51-Mutanten hypersensitiv gegenüber DNA schädigenden Agenzien sind und Fehler in der mitotischen und meiotischen Rekombination auftreten. Das Rad51-Protein bindet an ssDNA oder dsDNA und bildet dabei rechts gedrehte helikale Polymere. Das Rad51-DNA Nukleoproteinfilament beinhaltet dabei ~18-19 Basen oder Basenpaare und ~6 Monomere des Rad51 Proteins. Biochemische Analysen haben gezeigt, dass das Rad51-ssDNA Nukleoproteinfilament fähig ist, die Hybridisierung mit der homologen DNA zu katalysieren (San Filippo et al., 2008). Es zeigte sich aber auch, dass Rad51 nicht in der Lage ist, ssDNA in der Anwesenheit von RPA zu binden. Daher muss Rad51 zuvor mit dem BRCA2-Protein, ein bekanntes Tumoronkogen, assoziieren. BRCA2 enthält acht repetitive Domänen, an welche Rad51 binden kann. Hierbei binden die Domänen 1-4 freies Rad51 mit hoher Affinität. Hingegen zeigen die Domänen 5-8 nur eine sehr geringe Affinität für freies Rad51, jedoch eine sehr hohe Affinität für das ssDNA-Rad51 Nukleoproteinfilament. Durch diesen Mechanismus ist es BRCA2 möglich, weitere Rad51-Proteine an ein bestehendes Nukleoproteinfilament anzufügen und dabei die an die ssDNA gebundenen RPA-Proteine zu verdrängen (Carreira and Kowalczykowski, 2011).

### 1.2.2.1.2 Synapsis<sup>1</sup>

Im nächsten Schritt muss das Rad51-Nukleoproteinfilament eine homologe Sequenz finden, um durch Hybridisierung mit dem komplementären Strang einen sogenannten D-Loop zu bilden. Dieser als „Synapsis“ bezeichnete Prozess generiert einen DNA-Dreifachstrang, welcher als Ausgangspunkt für die weiteren Schritte dient. Eines der wichtigsten Proteine zur Prozess-Steuerung ist dabei das Rad54-Motorprotein. Rad54 bindet an das Rad51-Nukleoprotein-Filament und in Abhängigkeit von ATP findet eine Translokation auf der DNA statt. Experimentell konnte dabei gezeigt werden, dass in Anwesenheit von ATP und Rad54 eine Stimulation des Rad51 vermittelten DNA-Strangaustausches stattfindet (Heyer et al., 2006). Rad54 spielt daher nicht nur eine wichtige Rolle bei der Homologiesuche durch die Translokation, sondern auch durch die Aufwindung der Duplex-DNA und der Verdrängung der Nukleosomen (Heyer et al., 2006). Der Prozess der Homologiesuche lässt noch viele Fragen offen und ist immer noch wenig ergründet, allerdings deuten neuere Forschungsergebnisse darauf hin, dass kleine nicht-kodierende RNAs eine bisher unbekannte aber wichtige Rolle spielen. Wei et al. konnten sowohl in humanen als auch in pflanzlichen Zellen zeigen, dass durch Erzeugung eines DSBs kleine nicht-kodierende RNAs entstehen. Diese sogenannten diRNAs (Doppelstrangbruch induzierte RNA) entstehen durch die Transkription des antisense-Stranges upstream und downstream des DSBs. Es entstehen Transkripte, welche komplementär zur mRNA sind und mit dieser hybridisieren. Die Entstehung doppelsträngiger RNA führt zum Abbau der dsRNA mittels der RNAi-Maschinerie (DICER oder DICER-like; siehe auch Kapitel 1.4.3) und zur Entstehung 21nt langer RNA Sequenzen, welche von sogenannten ARGONAUT Proteinen gebunden werden. Die bisherige Hypothese sieht dabei vor, dass die diRNA-AGO-Komplexe entlang des DSB an die DNA binden und zu einer Rekrutierung der DNA-Reparaturmaschinerie führen, entweder durch direkte Interaktion oder durch Remodellierung des Chromatins (Wei et al., 2012).

Wurde eine komplementäre DNA-Sequenz gefunden, ermöglicht Rad54 den DNA-Polymerasen an die freien 3' OH Enden zu binden. Dies geschieht durch Verdrängen des Rad51-Proteins von der ssDNA. Anhand der nun vorliegenden Matrize werden die freien Enden verlängert und es bildet sich der sogenannte D-Loop. Der Bildung des D-Loops folgt der eigentliche Rekombinationsschritt, dessen Ablauf in zwei möglichen Modellen beschrieben ist. Das erste Modell beinhaltet die Bildung einer doppelten Holliday-Struktur („Double Holliday Junction“; dHJ).

---

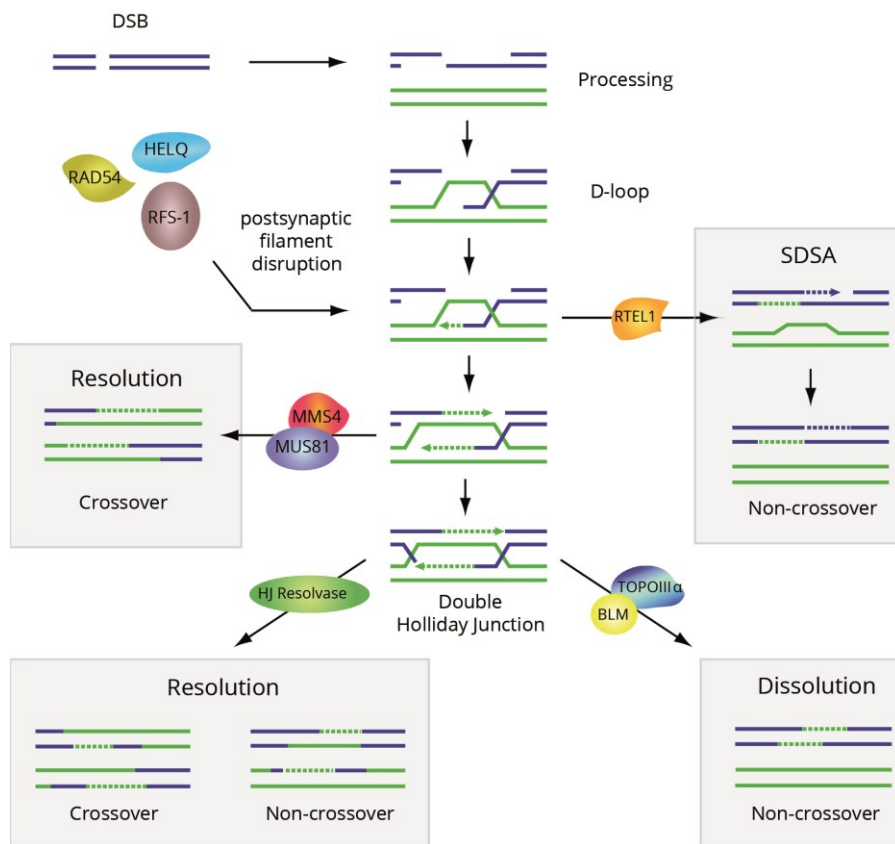
<sup>1</sup> \* Im weiteren Text werden die folgenden aus dem englischen stammenden Begriffe verwendet: sense für codogen; antisense für nicht-codogen; upstream für 5' Richtung; downstream für 3' Richtung.

---



### 1.2.2.1.3 Post-Synapsis

Im dHJ-Weg hybridisiert der durch das Nukleoproteinfilament verdrängte Strang mit dem zweiten Ende des DSBs. Dieser Vorgang wird durch Rad52 katalysiert. Das so gebildete Intermediat kann durch Verknüpfung aller freien Enden zu einer vollständigen dHJ reifen (Abbildung 10). Die gebildeten Intermediate können durch spezielle Endonukleasen in Crossover oder nicht-Crossover Produkte aufgelöst werden. Die Art des dHJ-Intermediates (nicked, unvollständige dHJ) ist ausschlaggebend dafür, welche Endonuklease die Struktur auflöst und ob ein Crossing-Over stattfindet (Ceballos and Heyer, 2011). Auch die entstehenden doppelsträngigen Produkte unterscheiden sich je nach Endonuklease.



**Abbildung 10 Post-Synapsis: Auflösung der Holliday-Struktur**

Aufgezeigt sind die verschiedenen Reaktionswege der homologen Rekombination. Nach der Bildung des D-Loops und einer doppelten Holliday-Struktur kann diese in Abhängigkeit von Endonukleasen und Topoisomerase in Crossover oder nicht-Crossover Produkte gelöst werden. Weitere Erläuterungen im Text. Aus: (Adelman and Boulton, 2010)

Mus81-Mms4 katalysiert zum Beispiel die Intermediate zu Doppelsträngen mit kurzen fünf Nukleotide langen Überhängen (flaps) beziehungsweise Lücken (Hollingsworth and Brill, 2004). Ebenfalls können die Holliday-Intermediate durch HJ-Resolvasen (Crossover oder nicht-Crossover) oder den Helikase/Topoisomerase Komplex BLM/TOPOIIIα (Crossover) gelöst werden.

SDSA (Synthesis-Dependent Strand Annealing) ist das zweite alternative Modell und beendet die DNA-Reparatur ohne die Bildung einer Holliday-Struktur und ohne ein erfolgreiches Crossover. In somatischen Zellen ist dies der dominante Reparaturmechanismus, da es hierbei zu keinem Crossover kommt, wodurch mögliche fehlerhafte Umordnungen der Chromosomen vermieden werden. Auch beim SDSA bildet sich zunächst eine dHJs, die jedoch durch eine Helikase (Srs2) (Knoll and Puchta, 2011) wieder aufgelöst wird. Anschließend wird der durch das

Nukeloproteinfilament hybridisierte ssDNA-Strang von einer DNA-Polymerase verlängert. Der verlängerte Strang wird dann von der DNA-Matrize gelöst und hybridisiert mit dem zweiten Ende des DSBs. Bestehende Lücken werden aufgefüllt und die Enden wieder ligiert (Abbildung 10) (Adelman and Boulton, 2010).

### 1.2.2.2 Nicht-homologe Endverknüpfung

Die Nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ; engl.: nonhomologous end joining) ist der vorherrschende Reparaturmechanismus in höheren Eukaryoten und findet hauptsächlich Anwendung in Phasen des Zellzykluses, in denen kein Schwesterchromatid vorhanden ist.

Die NHEJ beinhaltet drei Hauptschritte:

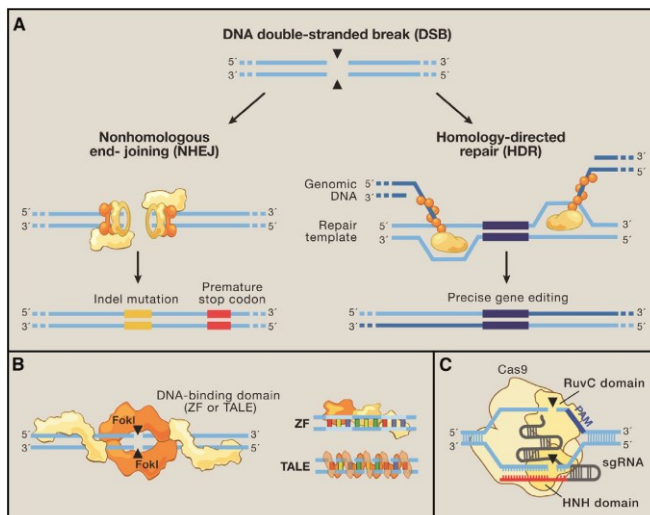
- a.) Erkennung des DSBs
- b.) Veränderung der Termini in ligierbare Enden
- c.) Verknüpfung der beiden DNA-Enden

Im Allgemeinen besteht eine kompetitive Situation zwischen den Erkennungskomplexen der HR (MRN) und des NHEJs (KU70 /K U80). Die Wahl des Reparaturmechanismus wird dabei vor allem von der aktuellen Zellzyklusphase bestimmt. Das NHEJ ist dabei in allen Phasen des Zellzyklus aktiv, jedoch hauptsächlich während der G1-Phase.

Die Initiation der NHEJ beginnt mit der Bindung von KU70 und KU80 (Abbildung 8 und Abbildung 11) als Heterodimer an die freien DNA-Enden. Dies führt zur Rekrutierung einer Kinase der DNA-PKcs (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit). Dieser Multiproteinkomplex stabilisiert die freien Enden und richtet diese aneinander aus. Abhängig von der Art des DSB werden nun verschiedene DNA-prozessive Enzyme hinzugezogen, wie zum Beispiel die Endonuklease-Artemis, welche die überstehenden Nukleotide entfernt. Schließlich werden im Zusammenspiel von Ligasen, Polymerasen und anderen Faktoren die freien DNA-Enden wieder miteinander verknüpft. Da diese Schritte oft mit dem Verlust einzelner bis mehrerer Nukleotide einhergehen, kann die NHEJ zu Mutationen führen, welche die Genfunktion beeinträchtigen oder sogar inaktivieren (Iyama and Wilson, 2013).

### 1.3 Generierung sequenzspezifischer DNA-Doppelstrangbrüche

In den folgenden Abschnitten wird auf die in dieser Arbeit verwendeten Methoden zur gezielten Genstilllegung eingegangen. Ausgangspunkt ist hierbei der Versuch, in einem der Zielgene einen Doppelstrangbruch der DNA zu verursachen, um mittels der eben beschriebenen Reparaturmechanismen eine Veränderung in der Basenpaarabfolge der DNA zu bewirken. Dies kann gezielt unter Verwendung eines homologen DNA Templates geschehen, welches eine Insertion, Deletion oder Änderung der Basenpaarabfolge generiert. Dabei werden die Mechanismen der HR (DSBR oder SDSA) verwendet. Wenn kein Template vorliegt, kann es mittels der NHEJ zu Insertionen oder Deletion (InDels) in der Zielsequenz kommen, was ebenfalls zu einem Funktionsverlust des Zielgenes führen kann (Abbildung 11 A).



**Abbildung 11 DNA-Doppelstrangbrüche**

(A) Das Ziel eines jeden Gen-Deletionsexperimentes ist der gezielt induzierte Doppelstrangbruch. Wird der DSB mittels NHEJ repariert, kann es zu InDels kommen und ein geändertes Leseraster führt zu einem verfrühten Stopcodon. Wird ein DNA-Template verwendet, kann die HR-Maschinerie (HDR) dafür verwendet werden, präzise Änderungen in der Zielsequenz zu verursachen. (B) Zinkfinger-Nukleasen und TALENs sind artifizielle DNA-Restriktionsenzyme, welche an die DNA-Zielsequenz binden und dort mittels einer fusionierten Restriktionsdomäne einen DSB verursachen. (C) Cas9 benutzt eine RNA-Matrize, um komplementäre DNA zu finden. RuvC und HNH sind Restriktionsdomänen, welche jeweils einen Einzelstrangbruch verursachen. Hierdurch entsteht eine DSB mit glatten Enden. Aus: (Hsu et al., 2014)

Die Generierung eines gezielten DNA-Doppelstrangbruches ist immer ein zweistufiger Prozess. Zuerst muss eine DNA-Bindedomäne am gewünschten Sequenzabschnitt binden, woraufhin eine DNA-Restriktionsdomäne einen DSB verursacht. Die bisher bekannten und angewandten Methoden können in zwei Kategorien eingeteilt werden. Zinkfinger-Nukleasen und TALENs (Abbildung 11 B) sind artifizielle Enzyme, die aus einer Fusion von DNA-Bindedomänen und einer DNA-Restriktionsdomäne (FokI) bestehen (Abbildung 11 B). Die zweite Kategorie beruht auf einem natürlich vorkommenden Enzym (Cas9), welches anhand einer RNA-Matrize an komplementäre DNA binden kann, um dort einen DNA-DSB zu verursachen (Abbildung 11 C).

### 1.3.1 Zinkfinger-Nukleasen

Zinkfinger-Nukleasen (ZFN) sind keine natürlich vorkommenden Enzyme, sondern bestehen aus zwei miteinander fusionierten funktionalen Einheiten. Die erste Einheit ist eine DNA-Bindedomäne, welche als Zinkfingerdomäne bezeichnet wird. Der Name resultiert aus der koordinativen Bindung eines  $\text{Zn}^{2+}$ -Ions zwischen einer  $\alpha$ -Helix und einem Anti-parallelen  $\beta$ -Faltblatt. Dabei wird das  $\text{Zn}^{2+}$ -Ion von zwei Histidinen und zwei Cysteinen koordinativ gebunden (Abbildung 12 A). Die Aminosäuren -1-6 der  $\alpha$ -Helix erkennen ein DNA-Triplett durch eine basenspezifische Bindung in der großen Furche der DNA-Doppelhelix. In einem ZFN-Protein werden 3-4 dieser Domänen hintereinander angeordnet. Am C-Terminus wird die zweite funktionale Einheit, eine DNA-Restriktionsdomäne, fusioniert. Diese entstammt einem natürlich vorkommenden DNA-Restriktionsenzym, dem FokI, welches aus *Flavobacterium okeanoikoites* isoliert wurde. Für die Anwendung in Zinkfinger-Nukleasen wird nur die C-terminale DNA-Restriktionsdomäne des FokI-Enzyms verwendet. Zinkfinger-Nukleasen bestehen also aus 3-4 N-terminalen Zinkfingerdomänen und einer C-terminalen DNA-Restriktionsdomäne (Abbildung 12 A).

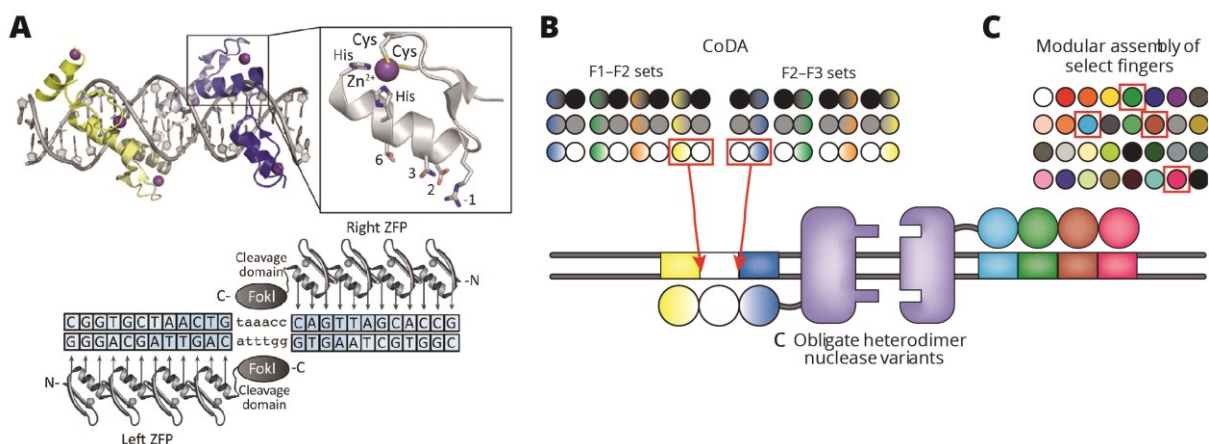


Abbildung 12 Zinkfinger-Nukleasen

(A) Zinkfinger-Nukleasen (ZFN) binden mittels einer  $\alpha$ -Helix in der großen Furche der DNA. Ein Zink-Ion wird durch Seitenketten koordinativ gebunden. ZFNs bestehen aus 3-4 gliedrigen Zinkfinger-Domänen und einer fusionierten FokI-Restriktionsdomäne. FokI kann als Dimer eine DNA-DSB verursachen. (B) CoDA – „Context dependent assembly“ verwendet experimentelle Datensätze um in silico Vorhersagen über das Verhalten neu generierter ZFN-Module zu treffen. (C) „Modular assembly“ verwendet Daten einzelner Zinkfinger-Domänen, um neue ZFN-Module mit möglichst hoher DNA-Bindeenergie zusammenzufügen.

Die ZFN-Technologie war die erste Anwendung in Mäuse-Zelllinien, um gezielt einen DNA-DSB zu verursachen und somit ein Gen zu verändern oder auszuschalten (Rouet et al., 1994). Allerdings gab es zu Beginn noch einige Hürden, die zu bewältigen waren. Ziel eines jeden Deletions-Experiments ist es, innerhalb eines Genoms spezifisch genau einen Gen-Locus zu verändern.

Würde mit der Zinkfinger-Technologie eine ZFN mit 3–4 Zinkfingerdomänen verwendet werden, ergibt sich eine Zielsequenz von 9–12 Basenpaaren (bp). Statistisch gesehen kommt eine 12 bp lange Sequenz einmal alle  $1,6 \times 10^7$  bp ( $4^{12}$ ) vor. Das humane Genom umfasst jedoch z.B.  $3 \times 10^9$  bp, wodurch nicht gewährleistet ist, dass eine ZFN nur einmalig innerhalb des Genoms schneidet. Der erste Schritt, um dies zu ändern, war die Konstruktion einer FokI-Restriktionsdomäne, die nur als Heterodimer einen DSB verursachen kann (Miller et al., 2007). Dadurch wird die Verwendung zweier ZFN-Proteine und eine Erweiterung der Zielfrequenz auf 18–24 bp ermöglicht. Somit kommt die gewählte Basenpaar-Abfolge nur noch einmal innerhalb von  $\sim 7 \times 10^{10}$  bp ( $4^{18}$ ) vor, was für eine einmalige Bindung innerhalb des Genoms ausreichend ist.

Eine weitere Herausforderung bestand darin, dass nicht für alle 64 Codons ( $4^3$ ) eine entsprechende Zinkfingerdomäne vorhanden war. Aus diesem Grund wurden in aufwendigen Permutationsexperimenten (Segal et al., 1999; Dreier et al., 2001) die sieben Aminosäuren der  $\alpha$ -Helix (Abbildung 12 A), welche die Bindung an die DNA ermöglichen, systematisch ausgetauscht, um neue DNA-Bindeeigenschaften zu generieren. Dies konnte erfolgreich durchgeführt werden. Da sich aber die DNA-Bindeeigenschaft der einzelnen Zinkfingerdomänen ändert, sobald sie in einem drei- oder vierfinger Modul integriert werden, wurden verschiedene Evaluierungsmethoden angewandt, um die Eigenschaften von neu zusammengefügt Zinkfinger-Modulen zu charakterisieren.

„Oligomerized Pool Engineering“ oder kurz „OPEN“ ist eine sehr viel präzisere Zinkfinger-Evaluierungsmethode. Hierbei werden die dreifinger-Module im Zusammenspiel getestet, was eine bessere Beurteilung des Gesamtverhaltens ermöglicht. Die Sequenzspezifität wird hier experimentell in einem „Bakterien-Zwei-Hybrid-System (B2H)“ getestet (Maeder et al., 2009). Kann ein zusammengefügt dreigliedriges Zinkfinger-Modul die vorgegebene Basenpaarsequenz erkennen, erfolgt die Aktivierung eines Reportergens. Je besser ein solches Modul an die Zielsequenz binden kann, desto höher ist die Transkription des Reporters. Auf diese Weise ist es möglich, Aussagen über die Bindeeigenschaften zusammengefügt Einzelmodule zu treffen. Eine Verdreifachung der Reporteraktivität wird hierbei als niedrigster Ausgangswert betrachtet. Das Problem dieses Ansatzes besteht darin, dass es eine hohe Anzahl an möglichen Triplet-Kombinationen gibt und nicht für jede steht ein experimenteller Datensatz zur Verfügung.

„Context Dependent Assembly“ oder kurz CoDA setzt an diesem Problem an. Innerhalb eines dreigliedrigen Zinkfingermoduls (F1 – F3) wird die mittlere Position (F2) als die Wichtigste für die DNA-Bindeeigenschaften angesehen. CoDA benutzt den experimentellen Datensatz von OPEN und generiert ZFNs durch Neukombination von F1 und F3 Modulen, von denen bekannt ist, dass

beide funktional sind im Zusammenspiel mit einer identischen zentralen F2-Domäne (Abbildung 12 C). Zusammengefasst bedeutet dies, wenn F1-F2-X und Y-F2-F3 funktionieren, dann besteht eine hohe Erfolgschance, dass die Kombination F1-F2-F3 ebenfalls funktioniert.

Ein optimales Paar von Zinkfinger-Nukleasen erkennt die gewählte Zielsequenz, bindet an diese und verursacht genau einen Doppelstrangbruch (DSB) innerhalb des Genoms. Leider ist dies oftmals nicht der Fall, denn verschiedene Faktoren beeinflussen die Funktionsweise von ZFNs. Im schlimmsten Fall erkennen die *in silico* konstruierten ZFNs nicht die Zielsequenz und sind somit nicht funktional. Das andere Extrem ist eine hohe „off-target“-Aktivität, was bedeutet, dass die ZFNs nicht nur innerhalb der Zielsequenz einen DSB verursachen, sondern auch an vielen weiteren Stellen im Genom. Dies kann zur Instabilität eines Genoms führen und schließlich zum Zelltod. Somit ist es oftmals nicht vermeidbar neu konstruierte ZFNs in weiteren Vorexperimenten zu testen. Optimaler Weise geschieht dies in dem Organismus, in welchem die Nukleasen später zur Anwendung kommen sollen. In Zellkultursystemen wie z.B. HEK293 oder HeLa wird hierzu ein Reportersystem verwendet, welches auf der Reparatur eines inaktivierten GFPs (grün fluoreszierendes Protein) beruht. Hierbei wird die ZFN-Zielsequenz in das GFP-Gen integriert, was zu dessen Funktionsverlust führt. Diese Sequenz wird zuerst stabil in das Genom einer Zelllinie integriert. Die so generierte Reporter-Zelllinie wird dann mit den zu testenden ZFNs transfiziert. Abhängig vom Design des Reportersystems, wird noch ein Teil des GFP-Gens als Reparatur-Matrize Co-transfiziert. Erkennen die ZFNs nun die Zielsequenz innerhalb des inaktivierten GFPs, entsteht ein DSB, welcher unter Zuhilfenahme der Reparatur-Matrize repariert werden kann. Diejenigen Zellen welche funktionale GFP-Proteine exprimieren, können nun anhand ihrer Fluoreszenz in einem Durchflusszytometer detektiert werden. Das Verhältnis von fluoreszierenden zu nicht-fluoreszierenden Zellen einer transfizierten Zellpopulation gibt Aufschluss über die Funktionalität der neu generierten ZFNs.

### 1.3.2 TALENs

TALENs (Transcription activator-like Effector Nucleases) sind, wie auch die Zinkfinger Nukleasen, synthetische Enzyme, die aus verschiedenen funktionalen Einheiten zusammengesetzt wurden. Prinzipiell ist der Aufbau jedoch homolog zu dem der ZFNs. N-Terminal befindet sich eine DNA-Bindedomäne, an welcher eine FokI-Nukleasedomäne fusioniert wurde. Ursprünglich sind TAL-Effektoren, wie der Namen erkennen lässt, Transkriptionsaktivatoren/-faktoren. TALEs wurden aus *Xanthomonas*, einem phytopathogenen gram-negativen Bakterium, isoliert. Über ein Typ III-Sekretionssystem werden TAL-Effektor Proteine von *Xanthomonas* in pflanzliche Zellen eingeschleust. Einmal in die Zelle gelangt, binden die TAL-Proteine an Promotorsequenzen von Genen, die eine Infektion der Pflanze durch *Xanthomonas* begünstigen. Das Interessante an den TAL Proteinen ist ihr modularer Aufbau. Im Gegensatz zu den Zinkfingern, welche an Basentriplets binden, können die DNA-Bindedomänen der TALEs jeweils ein einzelnes Nukleotid erkennen. Das bedeutet, es gibt nur vier unterschiedliche Module für die vier in der DNA vorkommenden Nukleotide (Boch et al., 2009). Alle Module (engl.: repeat variable diresidue, RVD) (Abbildung 13 A) weisen eine Länge von 34 Aminosäuren auf, unterscheiden sich jedoch jeweils in nur zwei Aminosäuren.

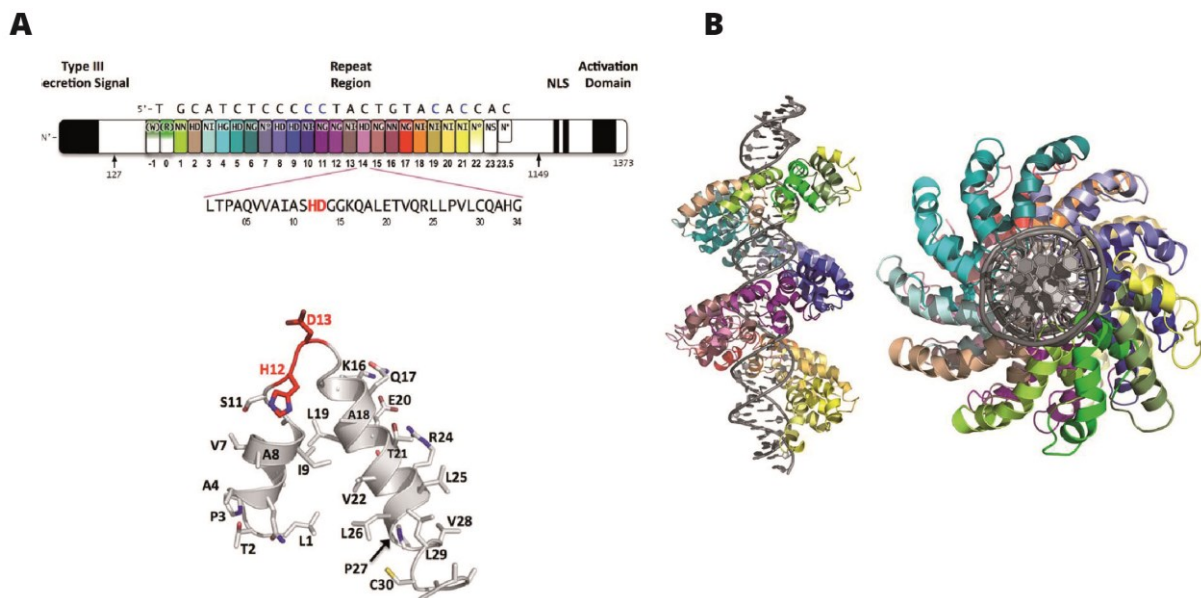


Abbildung 13 TAL-Effektordomänen

(A) TAL-Effektordomänen sind modular aufgebaute Transkriptionsfaktoren. Jedes der Module (farbig) erkennt hierbei eine Base der DNA. Die Module unterscheiden sich lediglich in zwei Aminosäuren (unten, rot) welche die Spezifität für A, T, G oder C codieren. C-Terminus befindet sich die Aktivator-domäne, welche für die Initiation der Transkription verantwortlich ist. (B) Die Kristallstruktur zeigt die spiralförmige Anordnung der DNA-Bindedomänen entlang einer DNA-Doppelhelix. Aus: (Mak et al., 2012)

Jene beiden Aminosäuren sind verantwortlich für die Basenspezifität der jeweiligen Domäne und sind ausschlaggebend für die jeweilige Bezeichnung der RVDs:

HD – erkennt Cytosin  
NN – erkennt Guanin  
NG – erkennt Thymin  
NI – erkennt Adenin

Die TAL-Effektoren aus *Xanthomonas* bestehen aus 23 RVDs, die hintereinander angeordnet sind. Ein wichtiger Vorteil gegenüber den ZFNs ist, dass es zwischen den Domänen keine störenden Wechselwirkungen gibt und somit eine beliebige Anordnung der RVDs möglich ist. Wie die Kristallstruktur zeigt, winden sich die Domänen propellerartig in der großen Furche der DNA und binden so an ihre Erkennungssequenz (Abbildung 13 B) (Mak et al., 2012).

Diese bisher einmalige Struktur eines DNA-Bindeproteins ermöglicht es, durch Anpassung der Reihenfolge der RVDs, jede beliebige Sequenz zu binden. Ein Nachteil der TALENs ist hingegen die Proteinlänge. Auch wenn für Deletionsexperimente die Anzahl der RVDs auf 12-15 verringert werden kann, besteht das Protein immer noch aus ungefähr 1000 Aminosäuren. Das ist in etwa das Vierfache einer ZFN und kann speziell in Organismen mit niedriger Expressionsrate heterologer Proteine ein Problem darstellen. Des Weiteren entstehen auf Ebene der DNA durch die sich wiederholenden Sequenzen der RVDs technische Schwierigkeiten beim Klonierungsvorgang. Um das Klonieren der RVDs zu vereinfachen, wurden spezielle Methoden entwickelt (Cermak et al., 2011; Zhang et al., 2011). Eine *de novo* Synthese wie es für ZFNs üblich ist, gestaltet sich aufgrund der repetitiven Sequenzen schwierig, ist jedoch auch möglich.



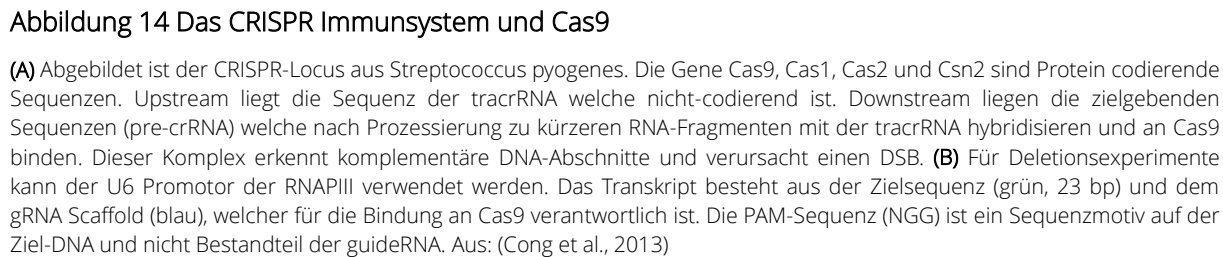
### 1.3.3 CRISPR/Cas9

Das CRISPR-System (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) ist ein adaptives prokaryotisches Immunsystem des Typs II. Es ist in vielen Bakterienarten vorhanden, das hier beschriebene stammt aus *Streptococcus pyogenes*. CRISPR dient dazu, das Bakterium vor Virusinfektion oder Fremd-DNA zu schützen (Gasiunas et al., 2012). Wie in Abbildung 14 dargestellt, besteht das CRISPR-System aus vier Genen (Cas9, Cas1, Cas2, Csn2) und zwei nicht codierenden RNAs (tracrRNA und crRNA). Die crRNA besteht aus einem Cluster von repetitiven Sequenzen (grau), welche von nicht-repetitiven Sequenzen unterbrochen werden (blau und grün). Die dazwischen liegenden, sich nicht wiederholende Sequenzen werden „Protospacer“ genannt. Sie stammen aus Fremd-DNA und werden vom Bakterium für die Identifikation von Fremd-DNA benutzt. Die pre-crRNA wird als ein Transkript synthetisiert und dann zu kleineren crRNAs (CRISPR-RNA) prozessiert. Die zweite nicht codierende RNA ist die tracrRNA (trans-activating CRISPR-RNA, rot). Diese bildet Sekundärstrukturen, welche es dem Cas9 Protein ermöglichen, eine spezifische Bindung mit der tracrRNA einzugehen. Zuvor hybridisieren komplementäre Sequenzabschnitte der tracrRNA und der crRNA zu einer doppelsträngigen RNA. Der so entstandene Komplex aus tracrRNA und crRNA bindet nun an Cas9 als Duplex-RNA.

#### 1.3.3.1 Die Cas9-Endonuklease

Mittels des Protospacers kann Cas9 die Ziel-DNA erkennen und in dieser einen DSB verursachen. Es entsteht ein glatter Strangbruch zwischen den Basen 18 und 19 des Protospacers. Das Cas9 Protein beinhaltet zwei Nukleasedomänen (RuvC und HNH) die jeweils einen DNA-Einzelstrang schneiden (Abbildung 14 A).

Ein weiteres bedeutendes Sequenzmotiv für die Erkennung der Zielsequenz ist das PAM-Motiv (protospacer adjacent motif). Es besteht lediglich aus drei Nukleotiden und variiert in den verschiedenen CRISPR-Systemen. In *Streptococcus pyogenes* hat es die Form NGG, N stellt dabei ein beliebiges Nukleotid dar. Das PAM ist nicht Teil der tracrRNA oder crRNA. Es ist ein Motiv, dessen Existenz auf der Ziel-DNA im Anschluss an die mit dem Protospacer hybridisierende Sequenz unerlässlich ist, damit die Cas9 crRNA nicht selbst aus dem Genom herausgeschnitten werden kann (Abbildung 14 B).



### 1.3.3.2 Die guideRNA

Würde man versuchen, die tracrRNA und crRNA mit einem eukaryotischen Promotor, welcher normalerweise von der RNA-Polymerase I erkannt wird, zu transkribieren, würde die entstandene RNA ein 5' CAP und 3' eine Poly-A Sequenz erhalten und aus dem Zellkern transportiert werden (Hocine et al., 2010). Da tracrRNA und crRNA Sekundärstrukturen ausbilden und damit zum Teil aus doppelsträngiger RNA bestehen, würden Proteine wie DICER (siehe dazu Kapitel 1.4.3) diese erkennen und möglicherweise abbauen. Um dem entgegenzuwirken, wird für die Transkription der tracrRNA und crRNA in Eukaryoten ein RNA-Polymerase III Promoter der U6 snRNA (small nuclear RNA), welche am Splicing im Zellkern beteiligt ist, verwendet. Der U6 Promotor bindet RNA-Polymerase III, welche kein 5' CAP an die RNA anfügt, so dass die RNA im Zellkern verbleibt. Von den RNA-Polymerase III Promotoren wird nur der U6 Promotor verwendet. Dies liegt vor allem darin begründet, dass beinahe alle nicht-codierenden RNA's Sequenzmotive innerhalb der transkribierten Sequenz enthalten, die für die Bindung der RNA-Polymerase III verantwortlich sind. Eine der wenigen Ausnahmen stellt die U6 snRNA dar, bei welcher sich alle Motive (PSE+TATA) für die Bindung der RNA Polymerase III 5' vom Startsignal befinden (Abbildung 15).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass tracrRNA und crRNA eine Duplex-RNA bilden, die im Anschluss an Cas9 bindet. Zur Verbesserung der Hybridisierung von tracrRNA und crRNA wurden die Sequenzen fusioniert und als eine sogenannte gRNA (guide RNA; Abbildung 14 B) transkribiert (Mali et al., 2013). Für Deletionsexperimente wird somit nur eine gRNA und das Cas9 benötigt.

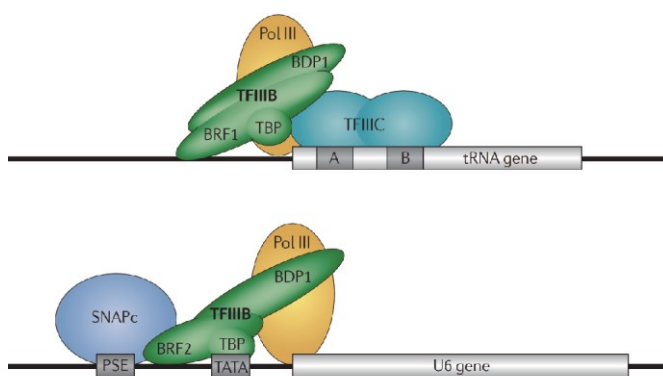


Abbildung 15 Promotorelemente der RNAPIII

Bei vielen RNA-Polymerase III Promotoren befinden sich die Sequenzen zur Bindung der Transkriptionsfaktoren innerhalb der transkribierten Sequenz (oben; z.B.: tRNA Gene). Ein sehr geringer Teil der RNAP III Promotoren, z.B. der U6 snRNA Promotor, liegt vollkommen upstream der transkribierten Sequenz (unten). Aus: (White, 2011).

## 1.4 Angewandte Methoden der Genstilllegung in *Chlamydomonas*

Es erfolgte eine vollständige Sequenzierung des Chloroplasten-, Mitochondrien- sowie des Zellkerngenoms von *Chlamydomonas* (Merchant et al., 2007). Die Erfassung dieser Daten stellte einen entscheidenden Schritt für alle Bereiche der *Chlamydomonas* Forschung dar. Für ein funktionales Verständnis des Genoms und des daraus resultierenden Proteoms, ist die Reverse Genetik, also das Ausschalten einzelner Gene, eine wichtige Methodik. Eines der Hauptprobleme in *Chlamydomonas* ist das Fehlen einer verlässlichen Methodik zur gezielten Genstilllegung. Im nächsten Abschnitt werden die bisher verwendeten Ansätze vorgestellt.

### 1.4.1 Einzelsträngige Plasmid-DNA

Boris Zorin analysierte in seinen Arbeiten zur Deletion des *PHOT*-Gens das Verhältnis von HR und NHEJ. Experimentell wurde ein doppelsträngiges DNA-Plasmid verwendet, welches ein promotorloses Antibiotika-Resistenzgen (*aphVIII*) beinhaltet, flankiert von Sequenzen homolog zur genomischen Phototropin Sequenz (Zorin et al., 2009). Es konnte gezeigt werden, dass nur in einem von  $10^4$  Fällen eine Integration der Plasmid-DNA durch HR in den Ziellokus Erfolg hatte. Diese sehr niedrige Frequenz der HR machte die Identifikation homologer Rekombinanten fast unmöglich. Erst durch die Verwendung einzelsträngiger DNA des zuvor erwähnten Plasmid-Konstruktes konnte das Verhältnis von HR zu NHEJ um den Faktor 100 verbessert werden (Zorin et al., 2005). Weitere Experimente an *COP1* und *COP3* zeigten, dass die Integration des Markergens in das Leseraster des Zielgens nur dann ein funktionales Resistenzprotein generiert, wenn das daraus resultierende Fusionsprotein hydrophil ist und im Zytoplasma löslich vorliegt. Da es sich im Falle von *COP1* und *COP3* aber um hydrophobe Membranproteine handelt, war es nicht möglich, die für das *PHOT*-Gen angewandte Methode auf diese Gene zu transferieren.

### 1.4.2 Insertions-Mutagenese und TILLING

Da bisher keine verlässliche Methode der gezielten Genstilllegung für *Chlamydomonas* etabliert werden konnte, verwenden Forscher weiterhin Methoden zur ungerichteten Deletion von

Zielgenen. Bei diesen Methoden handelt es sich zum einen um die Insertions-Mutagenese (IM) und zum anderen um TILLING (vom englischen: „Targeting induced local lesions in genomes“).

Insertions-Mutagenese ist eine weit verbreitete Methode. Dabei wird unabhängig von der Verwendung eines Promotors ein Antibiotika-Resistenzgen in *Chlamydomonas* transformiert, welches sich dann zufällig ins Genom integriert. Die Integration der Markersequenz innerhalb eines Gens führt dann im optimalen Fall zu dessen Funktionsverlust. Für die Detektion der Marker Integration innerhalb des gewünschten Zielgens werden große Sammlungen von Mutanten benötigt. Dabei ist es oftmals notwendig  $1-2 \times 10^4$  Mutanten zu analysieren. Um mögliche Insertionen zu finden, wird bei der Analyse-PCR sowohl eine genspezifische als auch eine markerspezifische Startersequenz verwendet (Gonzalez-Ballester et al., 2011). Nur bei erfolgter Integration des Markers in die Zielsequenz führt dies zu einem PCR-Produkt, so dass auf diese Weise gegebenenfalls Mutanten gefunden werden können. Die geringe Praktikabilität dieser Methode liegt im hohen Arbeitsaufwand. Dieser ergibt sich aus der großen Anzahl der zu analysierenden Mutanten sowie der dafür erforderlichen Vielfalt an - den für physiologische Analysen häufig notwendigen - unabhängig generierten Mutanten.

Mit der Analyse einer großen Anzahl an Mutanten hat, wie zuvor die IM, auch TILLING dieselbe Problematik. Bei dieser Methode werden chemische Mutagene eingesetzt, um Punktmutationen innerhalb des Genoms zu erzeugen. Die Identifikation einer Mutation innerhalb des Zielgens erfolgt durch die Verwendung einer speziellen Nuklease (Cel1). Diese Nuklease wurde aus der Selleriepflanze isoliert und schneidet doppelsträngige DNA an Stellen illegitimer Basenpaarungen (A-C, A-G, T-C, T-G). Für die Analyse werden PCR-Fragmente des Zielgens aus Mutanten mit PCR-Fragmenten des gleichen wildtypischen Gens gemischt und hybridisiert. Sollte sich eine Mutation in der Zielsequenz befinden, wird diese durch Zugabe von Cel1 detektiert, da heterogene Doppelstränge von der Nuklease geschnitten werden. Die so generierten kleineren Fragmente können dann bei einer DNA-Gelelektrophorese erkannt werden. Hauptproblem bei dieser Methode ist neben dem hohen Arbeitsaufwand das Auftreten von Hintergrund-Mutationen. Ursache hierfür sind die für die Mutagenese verwendeten chemischen Agenzien, die eine Anhäufung von Mutationen innerhalb des Genoms verursachen. Da häufig eine Mischung verschiedener Phänotypen vorliegt, kommt es zu einer erschwerten Ausgangssituation für phänotypische Untersuchungen.

### 1.4.3 RNA-Interferenz

IM und TILLING sind sogenannte Hochdurchsatz-Verfahren, die nicht in jedem Labor durchführbar sind. Daher haben sich noch weitere Methoden der Genstilllegung bewährt, die in einem Standardlabor angewendet werden können. Dazu gehört vor allem die RNA-Interferenz (RNAi). Sie beruht nicht darauf, eine Gensequenz zu verändern, sondern setzt auf Ebene der RNA an. Die durch Transkription erzeugte pre-mRNA oder mRNA wird vorzeitig abgebaut, und führt zu einer reduzierten Synthese des codierten Proteins. Da im Gegensatz zu den zuvor vorgestellten Methoden das Gen nicht komplett inaktiviert („Gen-Knockout“), sondern nur temporär ein Transkript reduziert wird, spricht man in diesem Falle von einem „Gen-Knockdown“. Es gibt verschiedene Wege der RNA-Interferenz, welche alle auf natürlichen Regulationsmechanismen der Zelle beruhen. Hier ist weniger der exakte Mechanismus relevant, sondern viel mehr die Grundlagen, welche nun kurz dargelegt werden. Prinzipiell ist die Entstehung einer doppelsträngigen RNA (dsRNA) der erste Schritt. Das geschieht durch die Transkription einer einzelsträngigen RNA (ssRNA), welche aus zwei hintereinander angeordneten komplementären Sequenzen besteht. Eine solche Anordnung der Sequenz ermöglicht eine Hybridisierung des Einzelstranges zu einem Doppelstrang und es entsteht eine sogenannte Haarnadelstruktur aus doppelsträngiger RNA. Diese Art von Molekülen wird von speziellen Nukleasen (Dicer oder Droshna) erkannt und in kurze etwa 20 - 25 Nukleotid lange Stücke geschnitten. Im nächsten Schritt wird die dsRNA von einem Enzymkomplex (RISC: vom engl. „RNA induced silencing complex“) gebunden und ein Strang der dsRNA wieder abgebaut. Mit Hilfe des entstandenen ssRNA Moleküls als Matrize erkennt das RISC-Protein die Ziel-mRNA und verursacht deren Abbau. Durch diesen Mechanismus wird die Menge der kodierenden mRNA reduziert, was zu einer verringerten Proteinexpression führt. Wie schon erwähnt, ist dies ein natürlicher Vorgang der eine zusätzliche Regulationsebene der Proteinexpression darstellt. Im Labor wird dieser Mechanismus genutzt, indem künstlich dsRNA-Moleküle erzeugt werden. Entweder durch genomische Integration einer Sequenz zur Erzeugung von dsRNA (siRNA) (Rohr et al., 2004) oder durch Einbringen synthetisch hergestellter dsRNA Moleküle in die Zellen (miRNA) (Schroda, 2006). Diese Methoden sind vielversprechend und führen für gewöhnlich zu guten Ergebnissen. In *Chlamydomonas* konnten auf diese Weise bereits 30 Gene analysiert werden. Ein Defizit dieser Methodik ist, dass es nur selten gelingt, ein Gen komplett zu supprimieren. Häufig bleibt eine 10-20 prozentige Genexpression bestehen. Dies ist zumindest in einigen Fällen kritisch, beispielsweise bei der Untersuchung von enzymatisch wirksamen Proteinen wie etwa Kinasen. In vielen Fällen ist die Suppression des Zielgens auch nur temporär möglich, da die Transkription der RNAi-Sequenz im Genom durch Methylierung der DNA verringert wird.

## 2. Zielstellung

Das Ziel dieser Arbeit ist die Weiterführung der von Dr. Boris Zorin, im Rahmen seiner Dissertation, durchgeführten Arbeiten zur gezielten Genstilllegung in *Chlamydomonas reinhardtii*. Die von Boris Zorin entwickelte Methode der homologen Integration eines Markergens in eine Zielsequenz, ist nicht auf codierende Sequenzen für membranständige Proteine anwendbar. Daher war das Ziel dieser Arbeit die Etablierung einer Methode zur Deletion von hydrophoben Membranproteinen. Bisher konnten lediglich in einem nicht-motilen Stamm, Gene durch homologe Rekombination deletiert werden. Für die die Arbeiten an den Photorezeptoren und physiologische Analysen, auch des phototaktischen Verhaltens, sollte daher ein Transfer der Methoden auf motile Stämme erfolgen.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Verwendung sequenzspezifischer Zinkfinger-Nukleasen

Ziel dieser Arbeit war es, eine Methode der gezielten Genstilllegung für *C. reinhardtii* zu entwickeln. Diese sollte einfach in der Handhabung sein und eine direkte Modifizierung kerncodierter Gene ermöglichen. Speziell sollte es auch möglich sein hydrophobe Membranproteine zu deletieren, wofür die von Zorin (Zorin et al., 2009) entwickelte Methode nicht geeignet ist. Deshalb wurde für die folgenden Experimente das vom *COP3* Gen codierte membranständige Kanalrhodopsin-1 (ChR1) Protein gewählt. RNA-Interferenz Experimente an *COP3* in Stamm CW2 haben gezeigt, dass eine Reduktion der Translation nicht lethal für *Chlamydomonas* ist (Berthold et al., 2008) und das ChR1-Protein gut detektierbar ist.

Die im Folgenden beschriebenen Arbeiten basieren auf Vorarbeiten von Dr. Irina Sizova. Zu Beginn der experimentellen Versuche waren zwei für das *COP3* Gen spezifische Nukleasen bereits vorhanden und konnten in einem von Dr. Sizova entwickelten Modellsystem und Modellstamm getestet werden. Da das bestehende System nur mit unbefriedigender Effizienz funktionierte, wurden drei Zielstellungen definiert: 1.) Die Effizienz des Modellsystems zu verbessern, 2.) Die Aktivität der Nukleasen zu optimieren und 3.) Eine geeignete Methode zu entwickeln, um gezielt Sequenzen im Zielgen zu verändern und diese Veränderungen effektiv zu Detektieren.

#### 3.1.1 *COP3*-ZFNs

Für die Herstellung *COP3* spezifischer Zinkfinger-Nukleasen wurde die genomische Sequenz des *COP3* Gens auf mögliche gute Bindestellen von dreigliedrigen ZFNs untersucht. Dies geschah unter Verwendung der öffentlich zugänglichen Zinkfinger-Datenbank (ZiFiT) des Zinkfinger-Konsortiums (Sander et al., 2007). Es konnte eine vielversprechende Bindestelle innerhalb des Exons 13 an Position 4699 – 4722 der *COP3*-DNA Sequenz identifiziert werden. Die von der Datenbank vorgeschlagenen dreigliedrigen ZFNs wurden nach der OPEN-Methode (siehe hierfür 1.4.2) generiert, (Sander et al., 2010) nachdem sie zuvor in einem „Bakterien-Zwei-Hybrid-System (B2H)“ evaluiert wurden. Für die rechte Seite der *COP3*-Zielsequenz konnte ein Modul (Datenbankeintrag: OZ179) mit einem sehr guten B2H-Wert von 14 (siehe dazu 1.3.1) gefunden werden. Im Folgenden wird die auf diesem Modul beruhende ZFN als *COP3*-R bezeichnet. Da für



die komplementäre linke Seite mittels OPEN kein dreifinger-Modul gefunden werden konnte, wurden hierfür einzelne Module nach der „Modular-Assembly“-Methode (siehe Kapitel 1.4.2) kombiniert. Es ist davon auszugehen, dass die einzelnen Basenpaar-Triplets von den jeweiligen Modulen erkannt werden, ihr Verhalten innerhalb eines dreifinger-Moduls könnte jedoch beeinträchtigt sein. Daher wurden für die linke Zielsequenz zwei unterschiedliche dreifinger-Module generiert, welche im Folgenden COP3-L1 und COP3-L2 genannt werden. Die Aminosäuresequenzen der  $\alpha$ -helikalen DNA-Bindedomänen sind für alle Module in Tabelle 1 angegeben. Die DNA-Sequenzen der Codon-optimierten Vollängen-ZFNs sind im Anhang aufgeführt (Kapitel 6.2).

**COP3-R-OPEN (OZ179)**

Module	F1	F2	F3
Triplett	GGC	GGC	GCC
Helix-Sequence	RGDHLDR	LKEHLTR	DPSNLRR

**COP3-L1+L2**

Module	F1	F2	F3
Triplett	GGG	GGA	GGC
Helix-Sequence L1	RSDKLVR	QRAHLER	DPGHLVR
Helix-Sequence L2	RSDHLAR	QSGHLQR	DRSHLAR

**Tabelle 1 Zinkfinger Helix Sequenz.**

Design der Zinkfinger-Module. Zu sehen ist die Helix-Peptidsequenz der DNA-Bindedomänen mit den zugehörigen Basentriplets. F1-F3 gibt die Fingerposition innerhalb eines Zinkfinger-Moduls an. Vollständige Sequenzen der verwendeten Zinkfinger-Nukleasen sind im Anhang gegeben.

#### 3.1.2 In Vivo Evaluierung

Das hier vorgestellte Modellsystem basiert auf der in der Einleitung (1.3.1) vorgestellten Methode der ZFN-vermittelten Reparatur eines Markergens. *Chlamydomonas* eignet sich allerdings aus zwei Gründen nicht für eine Analyse im Durchflusszytometer: Zum einen ist die Transformationseffizienz mit der Glasperlen-Methode (Kindle, 1990) zu gering ( $10^{-5}$ - $10^{-6}$ ), um eine Analyse durchzuführen, zum anderen erzeugt die Autofluoreszenz des Chloroplasten ein zu hohes Hintergrundsignal für eine exakte und aussagekräftige Analyse.

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde für *Chlamydomonas* ein Testsystem entwickelt, welches nicht auf der Reparatur eines Fluoreszenzmarkers beruht, sondern analog dazu die Funktionalität eines inaktivierten Antibiotika-Resistenzgens wiederherstellt. Ein erfolgreiches Testsystem erfüllt drei Hypothesen, welche im Folgenden überprüft werden: Im ersten Schritt sollte festgestellt werden, ob die neu zusammengesetzten ZFNs für die COP3-Zielsequenz

spezifisch sind. Dazu wurde die 24 bp Zielsequenz des *COP3*-Gens in ein Antibiotika-Resistenzgen integriert. Durch die Insertion der ZFN-Erkennungsstelle in das Resistenzgen und das Einfügen eines frühzeitigen Stopcodons, ist dieses nicht mehr funktional (Abbildung 16). Funktionale ZFNs sollten dann in der Lage sein, innerhalb des Resistenzmarkers die Zielsequenz zu erkennen und einen Doppelstrangbruch zu verursachen. Durch gleichzeitige Zugabe einer Reparatur-DNA Matrize kann dann die Antibiotika-Resistenz wiedergestellt werden, was die Selektion von Klonen ermöglicht. In den so erhaltenen Klonen kann davon ausgegangen werden, dass aktive ZFNs vorhanden sind, weil die Reparatur des Markers ohne diese nicht hätte stattfinden können. Da die Zielsequenz sowohl innerhalb des Markers und auch innerhalb des *COP3*-Gens vorhanden ist, können nun die erhaltenen Klone auf Mutationen innerhalb des eigentlichen Zielgens untersucht werden.

Für die Versuche in *C. reinhardtii* wurde die 24 bp Zielsequenz des *COP3*-Gens in das Antibiotika-Resistenzgen *aphVIII* (aminoglykosid 3'-phosphotransferase VIII; Paromomycin-Resistenz) (Sizova et al., 1996) eines *<sup>Sh</sup>ble::cagfp:aphVIII* -Testplasmides integriert. BLE ist ein Bindeprotein mit hoher Affinität für Antibiotika der Phleomycin-Familie (Zeocin). Die *cagfp*-Sequenz wurde als Verbindungsstück zwischen den beiden Resistenzmarkern integriert. Um das Testsystem auf seine Funktionsfähigkeit zu prüfen, wurde als Kontrolle zusätzlich die Erkennungssequenz der bereits als funktional charakterisierten Zif268:FokI Zinkfinger-Nuklease (Wright et al., 2005) in das *aphVIII* eingefügt (Abbildung 16 B). Zif268 fungiert als Zinkfinger-Transkriptionsfaktor, der N-terminal an die FokI-Restriktionsdomäne fusioniert wurde und DNA als Homodimer schneidet.

Das so erhaltene Plasmid p60 (Zif268/COP3) wurde für die Generierung eines Teststammes in den *C. reinhardtii* Stamm CW15-302 transformiert. Dieser Stamm wurde aufgrund seiner hohen Transformationseffizienz schon in den Experimenten zur Deletion des Phototropin-Gens verwendet (Zorin et al., 2009). Für die Selektion von Einzelkolonien wurde die transformierte Kultur auf Platten mit 10µg/ml Zeocin selektioniert. Die gewonnenen Einzelkolonien wurden mit Hilfe von PCR auf das Vorhandensein der kompletten Testkassette untersucht. Klon ZF37 zeigte die gewünschten Kriterien, die gesamte Testkassette war inklusive des 3' Terminators ins Genom integriert. Klon ZF37 wurde daher für die weiteren Untersuchungen verwendet. Western-Blot-Analysen haben zudem ergeben, dass Klon ZF37 wie erwartet ein verkürztes Fusionsprotein exprimiert (Abbildung 16 B).

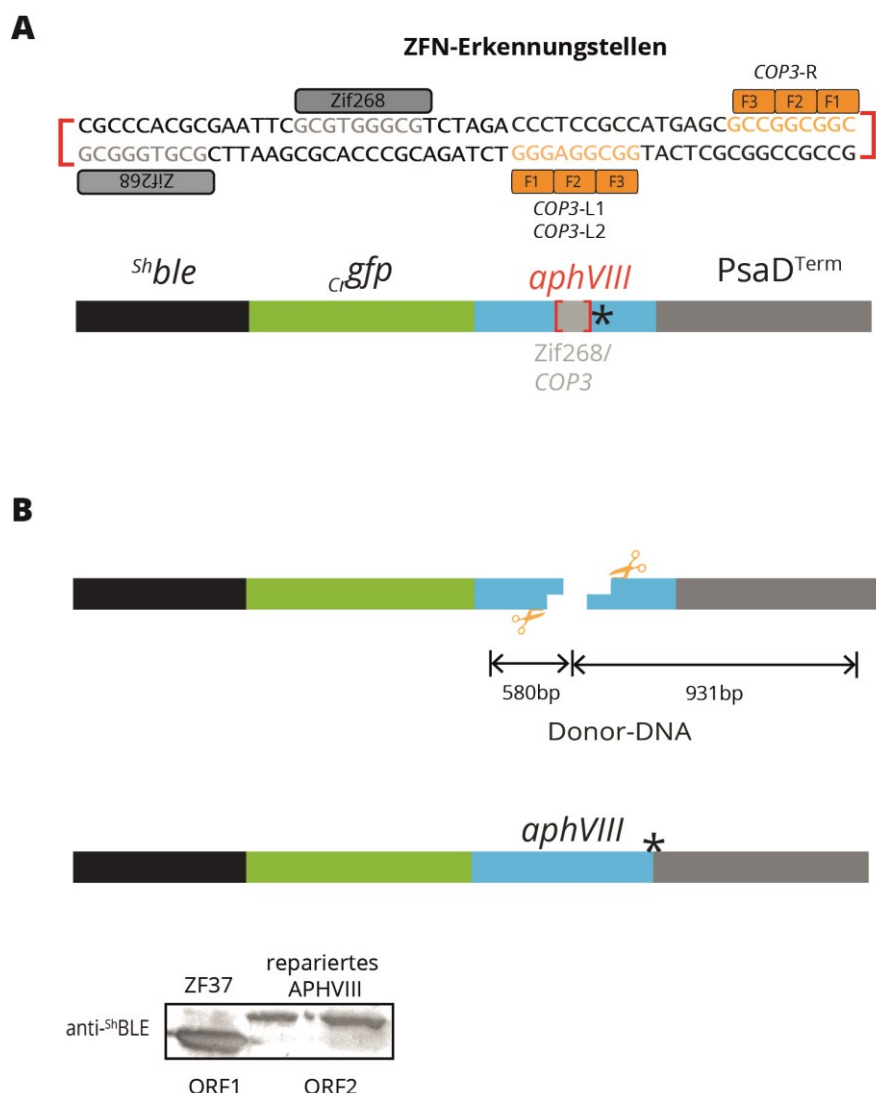


Abbildung 16 Schematische Darstellung Modellsystem p60

(A) Die Sequenz der ZFN-Erkennungsstelle (rote eckige Klammern) wurde in das *aphVIII*-Marker gen integriert und führt zu einem vorzeitigen Stopcodon (\* - Asterisk). (B) Durch Sequenz spezifische ZFNs (gelb) wird ein Doppelstrangbruch verursacht. Mittels homologer Rekombination mit einer Reparatur-Matrize (Donor-DNA, ohne ZFN-Erkennungsstelle) wird die ZFN-Erkennungsstelle entfernt und es entsteht ein funktionales *aphVIII*-Marker gen. Western-Blot-Analyse der Fusionsproteine vor (ORF1) und nach (ORF2) erfolgter Reparatur des *aphVIII*-Markers.

Im nächsten Schritt wurde Teststamm ZF37 mit Plasmid-DNA transformiert, welche für Zif268::FokI codiert. Da eine kontinuierliche Expression von ZFN-Proteinen zytotoxische Effekte haben kann, wurde der Hitze induzierbare Promotor HSP70A (Schroda et al., 2000) für diese Experimente verwendet. Als Matrize für die Reparatur des inaktivierten *aphVIII* wurde eine am 5' Ende um 120 bp verkürzte *aphVIII* Sequenz ( $\Delta 120\text{aphVIII}$ ) benutzt. Damit im Falle einer willkürlichen Integration ins Genom keine Antibiotika Resistenz entsteht, wurde die N-terminale ATP-Bindestelle entfernt. Für die Expression wurden keine weiteren Selektionsmarker verwendet, da aktive ZFNs die Voraussetzung für eine Reparatur des *aphVIII* sind. Die Homologieregionen der Matrize und des *aphVIII* reichen von der ZFN-Erkennungsstelle aus 580 bp in 5' Richtung und 931

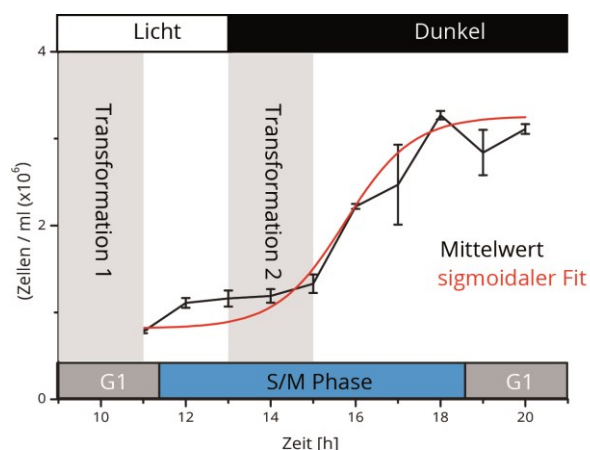
bp in 3' Richtung (Abbildung 16 B). Nach Selektion der transformierten ZF37-Kultur auf TAP-Agarplatten mit 10 µg/ml Paromomycin konnten 1–5 Paromomycin resistente (Pm-R) Kolonien isoliert werden. In Kontrollexperimenten, bei denen entweder keine Zif268::FokI Plasmid-DNA oder kein  $\Delta 120aphVIII$ -DNA Template verwendet wurden, kam es nicht zur Bildung resistenter Klone.

Mit Hilfe dieser Experimente konnte verifiziert werden, dass die konstruierte Modellkassette und der damit transformierte Teststamm ZF37 für einen Funktionalitätstest der COP3-ZFNs geeignet sind. Da für die Experimente mit der COP3-Zielsequenz heterodimere ZFNs verwendet wurden, kamen hierfür optimierte FokI-Restriktionsdomänen zum Einsatz. Miller et al. (Miller et al., 2007) konnten durch Insertion der Mutationen Q486E:I499L und E490K:I538K die Bildung von Homodimeren verhindern. Die so erzeugten und hier verwendeten FokI-Domänen werden fortan als „FokI<sup>M</sup>“ bezeichnet. In den folgenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass nur die Kombination von COP3-R und COP3-L1 zur erfolgreichen Reparatur des *aphVIII*-Gens in Stamm ZF37 führte. Die Kombination von COP3-R und COP3-L2 führte nicht zur Bildung von Paromomycin resistenten Kolonien. Die Reparatur des Selektionsmarkers im Fusionsprotein konnte auch in Western-Blot-Analysen gezeigt werden (Abbildung 16 B). Die Effizienz der Markergen-Reparatur durch die COP3-ZFNs war mit etwa 1–5 Pm-R Kolonien je Transformation vergleichbar mit Zif268::FokI. Jedoch war für weitere Experimente diese Rekombinationseffizienz zur Identifikation von COP3-Deletionsmutanten zu gering, unter der damaligen Annahme, dass etwa 100 bis 1000 Klone für die Identifikation einer COP3-Deletion analysiert werden mussten.

#### 3.1.3 Optimierung

Um die Rekombinationseffizienz zu erhöhen, wurden zwei verschiedene Ansätze verfolgt. Zum einen wurden Mutationen in die FokI-Nukleasedomäne (englisch: *FokI cleavage domain* – FCD) eingefügt, um die katalytische Aktivität (Guo et al., 2010) zu erhöhen. Zum anderen wurden die Kulturen des Teststammes ZF37 synchronisiert und zu verschiedenen Zeitpunkten des Zellzykluses transformiert. In vielen Studien zur Anwendung von ZFNs in pflanzlichen oder eukaryotischen Zellen wurden die Kulturen unter Verwendung von Zellzyklusblockern in der S-Phase arretiert, da die homologe Rekombination in dieser Phase eine höhere Aktivität besitzt. Grund hierfür ist, dass die HR der einzige DNA-Reparaturmechanismus ist, der eine fehlerfreie Reparatur der DNA während der Replikation erlaubt (Symington and Gautier, 2011). Die in diesen Studien verwendeten Zellzyklusblocker haben den großen Nachteil, dass sie ungewollte Mutationen verursachen können. *C. reinhardtii* kann hingegen recht einfach, ohne die Zugabe von Zellzyklusblockern, synchronisiert werden. Dazu muss die Kultur lediglich in einem Tag-Nacht-

Zyklus kultiviert werden. Da der hier verwendete Teststamm ZF37 bzw. der parental Stamm CW15-302 keine Flagellen besitzt, ist die zu erwartende Synchronität etwas geringer als z.B. in einem motilen Wildtypstamm. Um dies zu überprüfen, wurde eine Wachstumskurve des ZF37 Stammes aufgezeichnet (Abbildung 17). Tatsächlich konnte eine ausreichend gute Synchronisation erreicht werden, was sich im Anstieg der Zellzahl gegen Ende der Lichtphase zeigte. Bei nicht oder nur schlecht synchronisierten Kulturen würde die Zellzahl schon während der Lichtphase kontinuierlich ansteigen. Zur Überprüfung des synchronen Wachstums wurden vor den Experimenten die Kulturen mikroskopisch auf das Vorhandensein von teilungsaktiven Zellen überprüft. Diese sind unter dem Mikroskop gut als nicht-motile, zwei- bis viergeteilte Zellen zu erkennen.



**Abbildung 17 Synchronisation ZF37**

Eine ZF37 Kultur wurde in einem Licht-Dunkel-Zyklus synchronisiert. Die Zellzahl wurde stündlich gemessen. Gezeigt sind die Ergebnisse zweier unabhängiger Messungen. Die Werte wurden gemittelt und gefittet (rot). Die Zeitpunkte der Transformationen sind grau hinterlegt.

Um die katalytische Aktivität der *FokI*-Nukleasedomänen zu erhöhen, wurden zwei Mutationen (S418P und K441E) analysiert, die in Studien an HEK293-Zellen eine erhöhte Nukleaseaktivität bewirkten (Guo et al., 2010). Die Auswirkungen dieser Mutationen auf das ZFN-Verhalten in *Chlamydomonas* wurden auf Basis der *COP3-FokI<sup>M</sup>*-Heterodimere getestet, wobei alle hier im Folgenden beschriebenen Mutationen in beide Heterodimere integriert wurden.

ZF37-Kulturen wurden synchronisiert und zu Beginn der einsetzenden Teilungsphase (S/M-Phase) transformiert. Dabei zeigte sich, dass die Verwendung der S418P (*FokI<sup>M</sup>*-SP) oder K441E (*FokI<sup>M</sup>*-KE) Mutationen zu einer, im Vergleich zu den Kontrollen mit *FokI<sup>M</sup>*, drei- bis vierfachen Erhöhung der Anzahl an Pm-R Kolonien mit repariertem *aphVIII* führte (Abbildung 18 C). In der von Guo et al. durchgeführten Studie, ergab die Kombination beider Mutationen (*FokI<sup>M</sup>*-SP/KE) die höchste FCD-Aktivität. Wie sich in unseren Versuchen jedoch zeigte, führte diese Kombination zu einer mehr als vierfachen Abnahme der Pm-R Kolonien. Diese Reduzierung könnte das Resultat einer erhöhten „off-target“-Aktivität sein, welche zum Zelltod führte.

Eine genauere Betrachtung der *FokI*-Kristallstruktur (Wah et al., 1997) zeigte, dass Ser418 eine polare Bindung mit einem Phosphatrest am Rückgrat der DNA-Doppelhelix eingeht (Abbildung 18 B). Diese befindet sich in räumlicher Nähe zum Aktiven Zentrum (Asp450, Asp467, Ly469). Die Substitution von Ser418 durch eine Prolin führt zum Verlust der polaren Bindung zwischen der FCD und dem DNA-Rückgrat, welches eine Erhöhung der Nukleaseaktivität in Hek293-Zellen bewirkte (Guo et al., 2010). Die Modellierung eines Arginins an die Position Ser418 würde hingegen die Ausbildung einer zweiten polaren Bindung ermöglichen (Abbildung 18 B), welche in diesem Falle eventuell eine Abnahme der katalytischen Aktivität zur Folge hätte. Um diese Hypothese zu überprüfen wurde in den *COP3*-ZFNs Ser418 durch ein Arginin (FokI-SR) substituiert. Wie sich zeigte, war die Annahme korrekt und eine dreifache Reduzierung der Pm-R Kolonien resultierte aus diesen Experimenten. Im Gegensatz zur FokI-SP/KE Variante der FCD, welche aufgrund einer erhöhten Aktivität zu einer Verringerung der Pm-R Kolonien führte, ist bei der SR-Variante von einer verringerten Aktivität auszugehen. Da FokI-SP und FokI-KE eine Verbesserung der Rekombinationseffizienz bewirkten, wurde anschließend überprüft, ob auch in diesen Varianten die erhöhte Aktivität in einem gewissen Prozentsatz der Transformanten zytotoxische Effekte verursacht und einen Verlust von Pm-R Kolonien bewirkt. Daher wurde die SR-Mutation mit der KE-Mutation kombiniert (FokI-SR/KE) (Variante 5). Diese Annahme konnte nicht bestätigt werden; als Ergebnis konnte gezeigt werden, dass diese Kombination die höchste Anzahl an Pm-R Kolonien generierte (Abbildung 18 C).

Als nächstes wurde verglichen, in wieweit die Zellzyklusphase einen Einfluss auf die *aphVIII* Reparatureffizienz ausübt. Hierzu wurden ZF37-Kulturen synchronisiert und auch während der Wachstumsphase (G1) transformiert. Die Varianten SP und KE zeigten dabei, wie erwartet, eine bessere Reparatureffizienz während der S/M-Phase. Die Varianten FokI<sup>M</sup>, FokI-SR und FokI-SP/KE generierten nur sehr wenige Pm-R Kolonien und zeigten daher auch keine signifikanten Tendenzen. Transformationen mit FokI-SR/KE resultierten in beinahe gleich hohen Zahlen an Kolonien. Der Unterschied von G1 zu S/M war hierbei geringer als bei SP und KE (Abbildung 18 C). Da die untersuchten FokI-Varianten immer mit den gleichen Mutationen in beiden Heterodimeren getestet wurden, sollten in einem weiteren Versuch die möglichen Kombinationen aller generierten FokI-Varianten getestet werden (1L+2R, 1L+3R, 1L+4R, etc). Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe werden in Abbildung 18 D gezeigt. Dargestellt sind nur die am besten funktionierenden Kombinationen. Als positives Ergebnis ist festzuhalten, dass verglichen mit Transformationen von Nicht-synchronisierten Zellen mit FokI<sup>M</sup>, die FokI-SR/KE FCD-Variante (5L+5R) sowohl in G1 als auch S/M eine fünf- bis achtfache Verbesserung der Rekombinationseffizienz generierte. Auf Grund dessen wurde für alle weiteren Experimente der

gezielten Genstilllegung von *COP3* die SR/KE-Variante verwendet, um S/M synchronisierte Zellen zu transformieren.

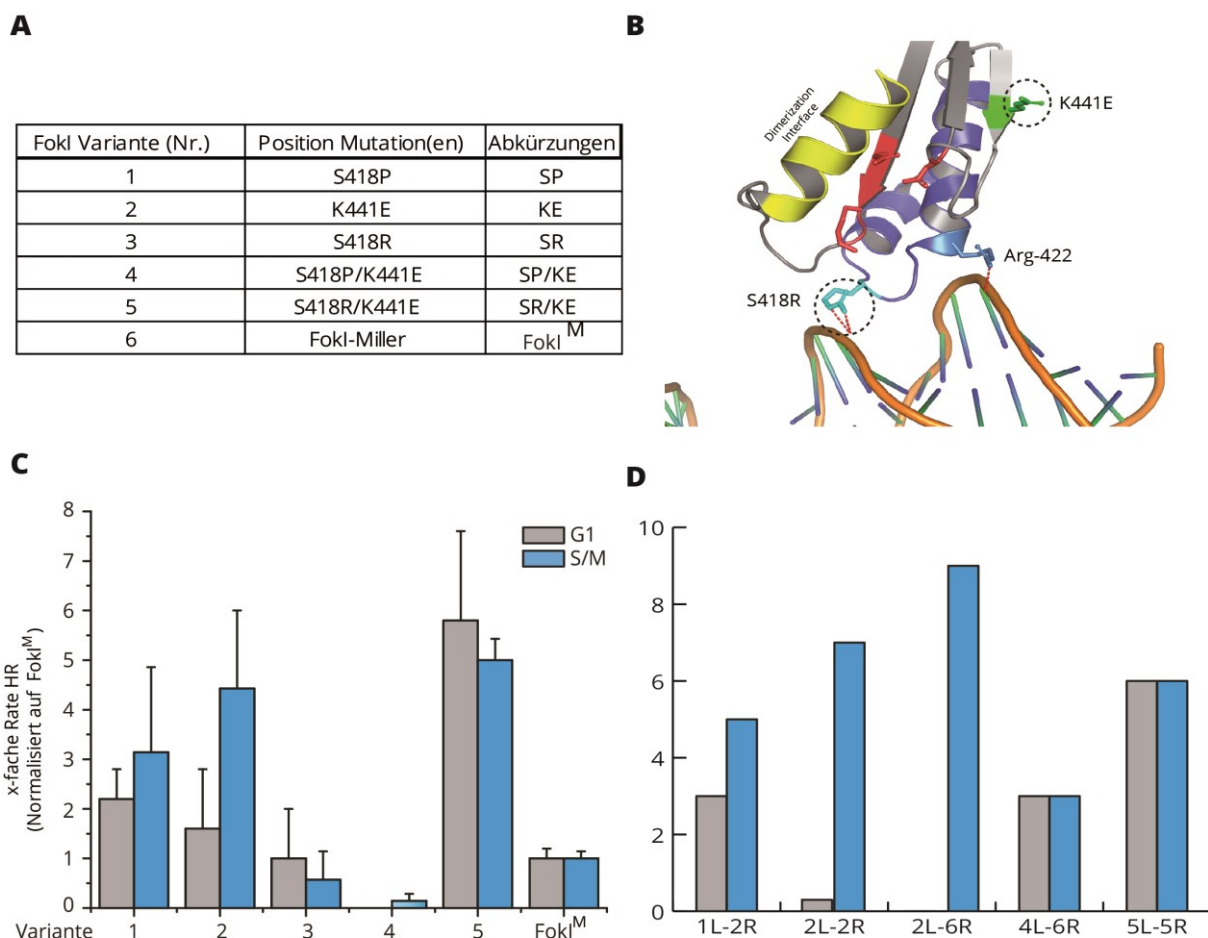


Abbildung 18 Vergleich FokI-Varianten

(A) Tabellarische Darstellung der verwendeten FokI-Varianten. (B) Modellierung der mutierten Aminosäuren in die Kristallstruktur der FokI-Domäne (PDB entry: FOKI) gebunden an DNA. Das aktive Zentrum ist in rot dargestellt, die Dimerisierungsdomäne in gelb und das Helix-turn-Helix-Motiv, welches die Bindung an DNA vermittelt, in blau. Durch gestrichelte Kreise hervorgehoben sind Substitution S418R in hellblau und K441E in grün. (C) Mutierte FokI<sup>M</sup>-Varianten wurden auf ihre Fähigkeit getestet, eine Verbesserung der HR zu bewirken. Synchronisierte Zellen wurden entweder während G1 (grau) oder S/M (blau) transformiert. Es wurden mindestens zwei unabhängige Experimente durchgeführt. Die Balken zeigen Mittelwerte dieser Experimente, die Fehlerbalken die Standardabweichung. Die Werte wurden auf die Anzahl der generierten Kolonien mit FokI<sup>M</sup> normalisiert. (D) Bedingungen analog zu C. Getestet wurden alle Kombination an generierten Varianten (1L+1R, 1L+2R, ...bis 6L+6R). Dargestellt sind die Ergebnisse der besten Kombinationen.

#### 3.1.4 Sequenzspezifische Insertionen oder Deletionen

Anhand der durchgeführten Vorversuche konnte nun eine ausreichend hohe Anzahl an Transformanten erzeugt werden, um nach Deletionen im *COP3*-Gen zu suchen. Dabei sollten die durch Verwendung der *COP3*-spezifischen ZFNs generierten Pm-R Kolonien des Modellstammes ZF37 untersucht werden. Wie schon in den beiden vorangegangenen Kapiteln gezeigt, diente die Paromomycin-Resistenz als Indikator für eine intrazelluläre Aktivität der ZFNs. Außerdem konnte

nun davon ausgegangen werden, dass die für die Transformation verwendeten ZFNs die *COP3*-Zielsequenz erkennen und möglicherweise sowohl im *aphVIII* als auch im *COP3*-Genlocus einen DSB verursachen. Für die Wiederherstellung eines funktionalen *aphVIII* wurde eine Matrizen-DNA ( $\Delta 120\text{aphVIII}$ ) verwendet, welche dann durch homologe Rekombination integriert wird. In den ersten Versuchen zur Detektion einer Deletion im *COP3*-Gen wurde auf die Verwendung einer Matrizen-DNA verzichtet. In diesem Falle erfolgt die Reparatur eines erfolgten DSBs durch Nicht-homologe Endverknüpfung (*non-homologous end joining*; NHEJ) der freien Enden. Dieser Reparaturmechanismus führt oft zu kleinen Insertionen oder Deletionen (InDels) innerhalb des Zielgens (Wright et al., 2005). Wie in Kapitel 1.4.2 beschrieben, können derartige Änderungen der Basenpaar-Abfolge mit Hilfe der Cel-1 Nuklease detektiert werden. Dies belegt eine detaillierte Studie von Perez-Pinera (Perez-Pinera et al., 2012), welche auf der Analyse des *ROSA26* Locus in Mäuse-Zelllinien beruht.

Die Analyse von 192 Pm-R Kolonien führte zur Detektion zweier Mutanten, bei denen die Anwendung der ZFNs zu einer 9 bp bzw. 18 bp (ZF37- $\Delta 9$  und ZF37- $\Delta 18$ ) Deletion innerhalb des *COP3*-Ziellocus führte. Der erhoffte Knockout des *COP3*-Gens blieb bei beiden Mutanten leider aus, da das korrekte Leseraster des Gens erhalten blieb. Darüber hinaus wurde ein Klon gefunden, der eine 3,5 kb Insertion innerhalb des Zielgens enthielt, somit konnte kein funktionales COP3 mehr translatiert werden. Die Sequenzierung dieser Insertion ergab, dass es sich um eine teilweise Kopie der Modellkassetten-Sequenz handelte, wobei die Sequenzinformation des Promotors bis hin zur ZFN-Bindestelle in das *COP3*-Gen inseriert wurde. Die Experimente zeigten, dass die durch den NHEJ-Reparaturmechanismus erzeugten Mutationen für unser Vorhaben wenig zuverlässig sind. Sie sind nicht vorhersehbar und wie im Falle von ZF37- $\Delta 9$  und ZF37- $\Delta 18$  auch oftmals nicht verwertbar. Die experimentelle Durchführung ist sehr aufwendig und die Detektion positiver Klone mittels Cel-1 Analysen in DNA-Polyacrylamidgelen schwer zu Visualisieren (Abbildung 19).

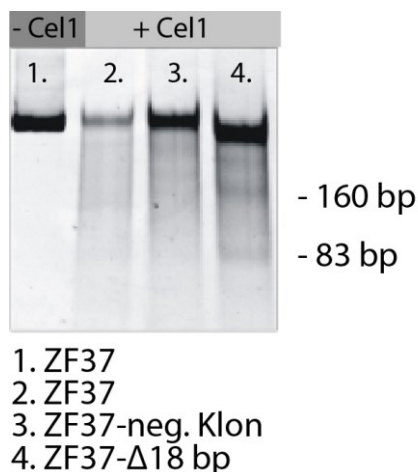


Abbildung 19 Cel1-Assay

Amplifikation der *COP3*-Zielsequenz mittels PCR auf genomischer DNA. Analyse möglicher Mutationen durch Cel1-Assay. DNA-PAGE: 1. ZF37 als Negativkontrolle ohne Cel1; 2. ZF37 + Cel1; 3. Selektierter Klon ohne Mutation; 4. Cel1-Verdau mutierter heteroduplex-DNA.



Da die Zielstellung in der Entwicklung einer verlässlichen Methode zur gezielten Sequenzveränderung bestand, wurde für weitere Experimente eine DNA-Matrize für das *COP3*-Gen verwendet. Dies sollte eine genaue Sequenzveränderung durch homologe Rekombination mit dem Zielgen ermöglichen.

Die meisten Studien der homologen Integration einer Matrizen-DNA in ein Zielgen stellten eine Abnahme der Effektivität mit kürzer werdender Sequenzhomologie fest. Daher wurde in ersten Versuchen eine Matrizen-DNA verwendet, die 2 kb in 5' und 3' Richtung ausgehend von der ZFN-Bindestelle umfasste. In die ZFN-Bindestelle der Matrize wurde eine 58 bp lange Sequenz integriert, die ein FLAG-Tag codiert (Einhauer and Jungbauer, 2001). Die Insertion zwischen der *COP3*-R und *COP3*-L1 Erkennungssequenz sollte eine mögliche weitere Hybridisierung der heterodimeren FokI-Nukleasedomänen verhindern, somit können die ZFNs nach der Integration der Donor-DNA keinen Doppelstrangbruch mehr verursachen. Außerdem wurden in das Template zwei Stopcodons eingefügt, die einen vorzeitigen Translationsstop verursachen. Mittels Western-Blot-Analysen dieser Transformanten, unter Verwendung eines *COP3* spezifischen primären Antikörpers, konnten keine Deletionsmutanten des *COP3*-Gens gefunden werden. Die Problematik der Western-Blot-Experimente ist die relativ geringe Anzahl an Klonen, die gleichzeitig analysiert werden kann. Bei der experimentellen Durchführung dieser Analysen mussten kleine Geltaschen verwendet werden, um die Analyse einer größeren Anzahl an Proben zu ermöglichen. Beim Beladen der Geltaschen kann es auch bei vorsichtiger Handhabung leicht zur Überführung von Probenmaterial in benachbarte Taschen kommen. Die Folge ist eine Signaldetektion, die mögliche Deletionsmutanten überdeckt. Zu diesem Zeitpunkt konnte noch keine Aussage darüber getroffen werden, wie viele Analysen von Transformanten nötig sein werden, um eine Deletionsmutante zu identifizieren. Die Analyse mit PCR stellt daher eine effizientere Detektionsmethode dar.

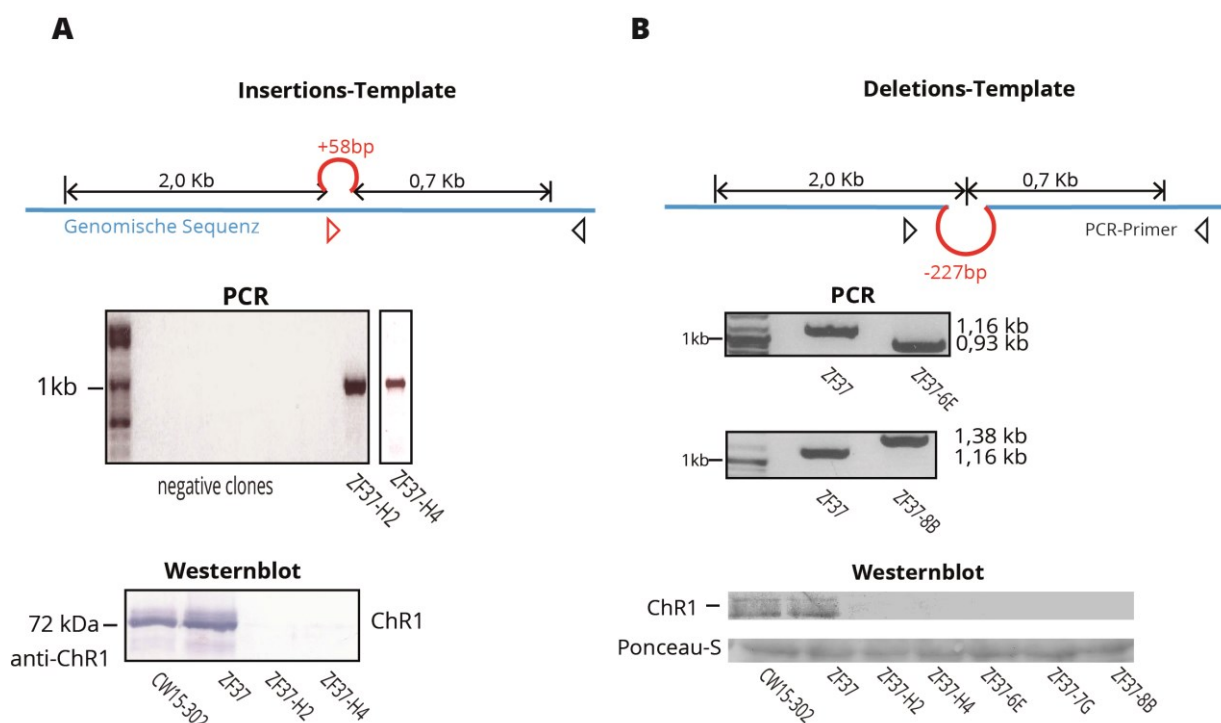


Abbildung 20 Template-DNA Design

(A) Insertions-Template: Schematische Darstellung des Insertions-Templates. Angegeben ist die Homologieregion (geschlossene Pfeile) 5' und 3' der ZFN-Zielsequenz. Die 58 bp Insertion ist in Rot dargestellt. Innerhalb dieser Sequenz bindet der vorwärts gerichtete Primer (rotes Dreieck). Der komplementäre Rückwärts-Primer bindet außerhalb der Homologieregion (schwarzes Dreieck). Nur korrekt insertierte Template-DNA kann amplifiziert werden. Mitte: Klon ZF37-H2 und -H4 generierten das korrekte PCR-Produkt. Unten: Western-Blot-Analysen zeigen keine Expression von ChR1 in H2 und H4. (B) Deletions-Template: Schematische Darstellung des Deletions-Templates (oben). Angegeben ist die Homologieregion (geschlossene Pfeile) 5' und 3' der ZFN-Zielsequenz. Insertion der Donor-DNA führt zu einer 227bp Deletion in COP3. Generierte PCR-Produkte sind daher verkürzt. Mitte: Klon 6E zeigt die erwartete verkürzte COP3-Sequenz. Klon 8B zeigt eine unspezifische Integration von ca. 200bp. Western-Blot-Analysen zeigen keine Expression von ChR1 in 6E und 8B.

Für die Detektion der korrekten Template-DNA Integration in das Zielgen mittels PCR wurde die 3' homologe Sequenz des „Insertions-Templates“ auf 700 bp verkürzt. Diese Verkürzung der Homologie war nötig um eine verlässliche Detektion mittels PCR zu erlauben. Bei derartigen Analysen werden meist sogenannte „pooling“-Strategien benutzt, das heißt man analysiert keine Einzelkolonien, sondern kombiniert mehrere Klone, um einen höheren Durchsatz zu ermöglichen. Für die Detektion von Deletionsmutanten mittels PCR konnte aber kein „Pooling“ verwendet werden, da die Gefahr einer durch Amplifikation der möglicherweise nicht-homolog integrierten Template-DNA (Flag fw) verursachten Hybridisierung mit Wildtyp-Fragmenten besteht, was ein falsch positives Signal erzeugen würde. Um dennoch eine möglichst große Anzahl an Klonen in möglichst kurzer Zeit analysieren zu können, wurde die von Cao et. al (2009) beschriebene Methode der Kolonie-PCR angewandt. Vorversuche haben ergeben, dass mit dieser Methode isolierte genomische DNA nur schwer erlaubt, PCR-Fragmente die größer als 1kb sind zu amplifizieren. Die homologen Regionen für das Insertions-Template sind in Abbildung 20 dargestellt. Die Analyse genomischer DNA aus 96 Klonen ergab zwei positive Signale mittels PCR (ZF37-H2 und ZF37-H4) (Abbildung 20 A). Diese Klone hatten erfolgreich exakt das Template in

den *COP3*-Locus integriert und exprimierten kein funktionales ChR1-Protein mehr. Beruhend auf demselben PCR-basierenden Analyseprinzip wurde von Dr. Sizova ein „Deletions-Template“ hergestellt, um eine 227 bp Sequenz aus dem *COP3*-Gen zu entfernen. Auch dies führte mit derselben Häufigkeit von 1% zu einer Ausschaltung des *COP3*-Gens (Abbildung 20 B, ZF37-7G + ZF37-8B). Somit konnte gezeigt werden, dass es zumindest in dem *Chlamydomonas*-Stamm CW15-302 mittels Zinkfinger-Nukleasen möglich ist, sowohl Insertionen als auch Deletionen in einem Zielgen zu erzeugen.

**Tabelle 2 Mutationen**

Übersicht der induzierten Änderungen des *COP3*-Gens in *Chlamydomonas*.

Klon	Art der Mutation	Flankierende Sequenzen	Mechanismus	<i>COP3</i> -Deletion
ZF37 - Δ9 bp	Deletion (9 bp)	4709-4717	NHEJ	Nein
ZF37 - Δ18 bp	Deletion (18 bp)	4730-4747	NHEJ	Nein
ZF37 - C11	Insertion (3.5 kb)	4709-4715	NHEJ	Ja
ZF37 - FLAG (H2 + H4)	Insertion (58 bp,FLAG)	4715-4716	HR	Ja
ZF37 - Δ227 (6E, 7G)	Deletion	4478-4714	HR	Ja
ZF37 - Ins243	Del. (8 bp) + Ins. (243 bp)	4478-4714	NHEJ	Ja

Versuche, diesen Ansatz auch in motilen Stämmen durchzuführen, werden im nächsten Kapitel besprochen.

## 3.2 Modellsystem

### 3.2.1 *Cop5*-ZFNs und -TALENs

Nach der erfolgreichen Applikation der *COP3*-ZFNs im Modellstamm ZF37 sollte im Weiteren auch versucht werden, neu generierte *COP5*-ZFNs zu verwenden. Außerdem wurden zwei Paare von TALENs gegen die *COP5*-Zielsequenz hergestellt. Das Klonieren der TALEN-RVDs (repeat-variable diresidue; siehe Kapitel 1.3.2) wurde im Labor von Prof. Feng Zhang (Broad Institute/MIT) durchgeführt und uns anschließend zur Verfügung gestellt. In Abbildung 21 A ist die verwendete *COP5*-Zielsequenz (blau) dargestellt. Analog zur vorherigen Herangehensweise wurde die Zif268-Zielsequenz aus Plasmid p60 durch die *COP5*-Zielsequenz ersetzt. Als Kontrolle für die Funktionalität eines möglichen neu hergestellten Modellstammes wurde die *COP3*-Zielsequenz beibehalten. In Abbildung 21 B ist die Nukleotid- sowie Proteinsequenz der *COP5*-Zinkfingerdomänen gegeben. Für die *COP5*-TALENs ist exemplarisch TALEN-L1 aufgeführt, um einen Überblick der Sequenzstruktur zu geben. Die beiden für die Basenspezifität verantwortlichen Aminosäuren sind rot unterlegt. Die exakten Zielsequenzen aller *COP5*-Nukleasen sind zudem tabellarisch aufgeführt. Das Design der *COP5*-Zielsequenz wurde so gewählt, dass die Möglichkeit besteht, auch eine Kombination aus ZFNs und TALENs zu verwenden, um gegebenenfalls eine mögliche schlecht bindende ZFN durch eine TALEN ersetzen zu können.

Zu diesem Zeitpunkt der Arbeiten wurde auch versucht, die erfolgreich verwendete Methode der *COP3*-Deletion in Stamm CW15-302 auf einen motilen Stamm zu übertragen. Es stellte sich allerdings heraus, dass die Herstellung eines motilen Modellstammes mit der bisherigen Modellkassette nicht möglich war. Die Anzahl von Klonen, die eine p60-Testkassette komplett integriert hatten, war sehr gering (~1-5 %). Alle Versuche einer erfolgreichen Reparatur des *aphVIII* durch Applikation der *COP3*-ZFNs in den wenigen erhaltenen Modellstämmen blieben erfolglos. Auch erste Versuche die *COP5/COP3* Testkassette in Stamm CW15-302 zu integrieren schlugen fehl. Infolgedessen wurde als Zwischenziel eine Verbesserung der bisher verwendeten Modellkassette angestrebt.



### 3.2.2 Optimierung der Modellkassette.

Da alle bisherigen Versuche in Stamm CW15-302 durchgeführt wurden, sollte nun eine Übertragung der in 302 etablierten Methode auf motile Stämme versucht werden. Hierfür wurde zunächst die bisherige Modellkassette verwendet. Für erste Versuche wurden die Stämme CC-503 und CC-3403 mit dem *<sup>Sh</sup>ble::<sub>cr</sub>gfp:aphVIII* Testplasmid (p60, Abbildung 22) transformiert und die durch Selektion auf Zeocin (7,5 µg/ml TAP-Agar) erhaltenen Klone auf Integration der Testkassette mittels PCR überprüft. Dabei wurden Primer verwendet, die den für die homologe Rekombination nötigen Sequenzabschnitt amplifizierten (*aphVIII* - PsaD Terminator). Für jeden Stamm erfolgte eine Analyse von 24 Kolonien. Dabei konnte für CC-503 ein positiver Klon und für CC-3403 drei positive Klone gefunden werden. Wie zuvor für Stamm ZF37, fanden Transformationen synchronisierter Kulturen mit Zinkfinger-Nukleasen (COP3-L1+COP3-R) und dem für die Reparatur des *aphVIII*-Markers nötigen Donor-Plasmid ( $\Delta 120\text{aphVIII}$ -PsaD Ter.) statt. In keinem der vier transformierten Stämme konnten positive Klone auf Paromomycin selektioniert werden.

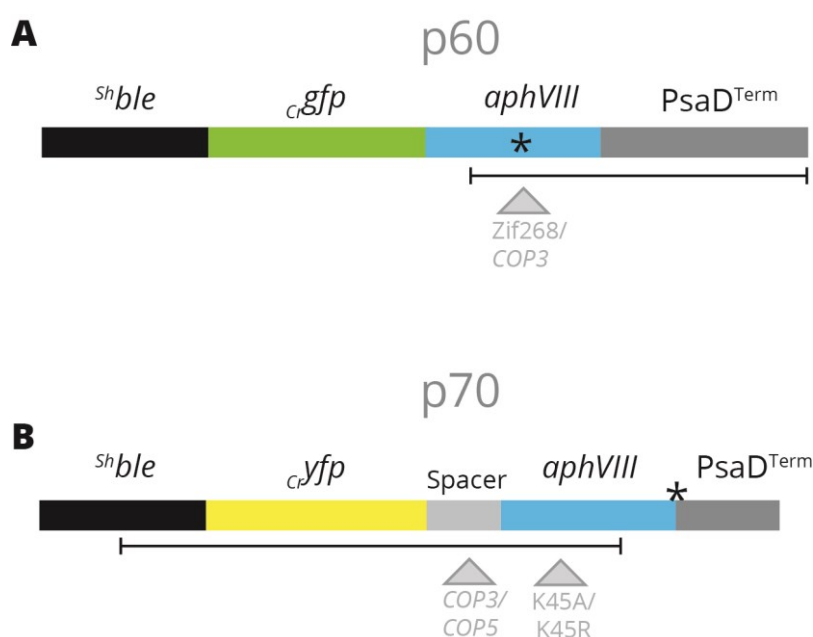


Abbildung 22 Schematische Darstellung der Modellkassetten p60 und p70

(A) p60: Schematische Darstellung der Modellkassette. Die Translation des BLE:GFP:APHVIII-Fusionsproteins durch eines von der Zif268/COP3-Zielsequenz (grauer Pfeil) verursachten Stopcodons (Asterisk) erfolgt nicht vollständig. Die für die Reparatur des *aphVIII* verwendete Homologieregion ist durch eine geschlossene Linie dargestellt. (B) p70: Ein Codon optimiertes *cr*yfp ersetzt das zuvor verwendete *cr*gfp. Der Leserahmen des Fusionsproteins bleibt erhalten. Die Inaktivierung des *aphVIII* erfolgt durch Mutation K45A oder K45R. Die ZFN-Zielsite wurde als Spacer-Sequenz zwischen *Cryfp* und *aphVIII* integriert. Als Terminator wurde der RbcS2-Terminator verwendet.

Um ein verlässliches Selektionssystem für die Anwendung in *C. reinhardtii* entwickeln zu können, war eine Verbesserung der bisher verwendeten Modellkassette (p60) in verschiedenen Punkten erforderlich.

Erster Punkt hierbei war der vorzeitig beendete Leserahmen des Fusionsproteins in p60. Die Insertion der Zielsequenz innerhalb des *aphVIII* führte zu einem vorzeitigen Stopcodon, welches sich etwa 200 bp vor der Terminator-Sequenz befindet. Dies kann möglicherweise zu einem sogenannten „nonsense mediated decay (NMD)“ der mRNA führen. Dieser zelluläre Mechanismus dient dazu, falsch transkribierte mRNA Sequenzen abzubauen (Maquat, 2004).

Der zweite Punkt, der verbessert werden soll, stellt das in p60 verwendete *c<sub>gfp</sub>* dar. In keinem der bisher hergestellten Modellstämme konnte eine Fluoreszenz des GFP detektiert werden. Dies würde jedoch eine Vorselektion möglicher Modellstämme erleichtern.

Der dritte Punkt ist der für die Homologieregion verwendete PsaD-Terminator. Terminatoren enthalten repetitive Sequenzen, welche eine Amplifikation mittels PCR erschweren. Dies ist relevant für die Selektion der Modellstämme und die spätere Analyse der selektionierten Klone.

Um die Testkassette in diesen drei Punkten zu verbessern, wurde zuerst das *c<sub>GFP</sub>* durch das in Pflanzen häufiger verwendete YFP ersetzt. Das YFP-Protein hat eine Anregungswellenlänge von 515 nm, welches im Gegensatz zum GFP (480nm) im schwach absorbierenden Bereich der Chlorophylle, in der sogenannten „Grünlücke“, liegt. Durch Anregung bei 515 nm kann die durch das Chlorophyll a/b verursachte Hintergrundfluoreszenz deutlich minimiert werden. Für diesen Schritt wurde die codierende Sequenz des YFP wie das früher verwendete GFP (Fuhrmann et al., 1999) für die Anwendung in *C. reinhardtii* Codon-Optimiert (*c<sub>yfp</sub>*).

Als nächstes wurde der Leserahmen des *aphVIII* geändert, um ein mögliches NMD der mRNA zu verhindern. Dazu wurde die Zielsequenz an das 5´ Ende des *aphVIII* versetzt und diese so gewählt, dass der Leserahmen nicht vorzeitig unterbrochen wird (Abbildung 22 B). Für die nötige Inaktivierung des *aphVIII*-Markers werden die in der Literatur beschriebenen Mutationen K45A oder K45R (Wright and Thompson, 1999; Nurizzo et al., 2003) eingefügt. K45A stellte hierbei eine Inaktivierung des Markers dar. K45R ist als eine etwa 10-fache Reduktion der Aktivität beschrieben. Die K45R-Mutation wurde zuerst getestet, da es dieses Konstrukt ermöglicht, in einem ersten Schritt wie gewohnt auf Zeocin zu selektieren und diese Klone dann zusätzlich in einem weiteren Schritt auf niedrigen Konzentrationen von Paromomycin. Dadurch können molekularbiologische Analysen der Modellkassette vermieden werden. Die so ausgewählten Stämme können nach Reparatur des *aphVIII* auf höheren Paromomycin-Konzentrationen selektiert werden.

Durch die Versetzung der Zielsequenz an das 5' Ende des *aphVIII*, kann die verwendete Donor-DNA so gewählt werden, dass die Terminator-Sequenz nicht innerhalb des Templates liegt. Für die Inaktivierung des auf dem Donor-Plasmid liegenden *aphVIII* wurden 75bp am 3' Ende entfernt (3'  $\Delta$ 75 *aphVIII*, Abbildung 22 B).

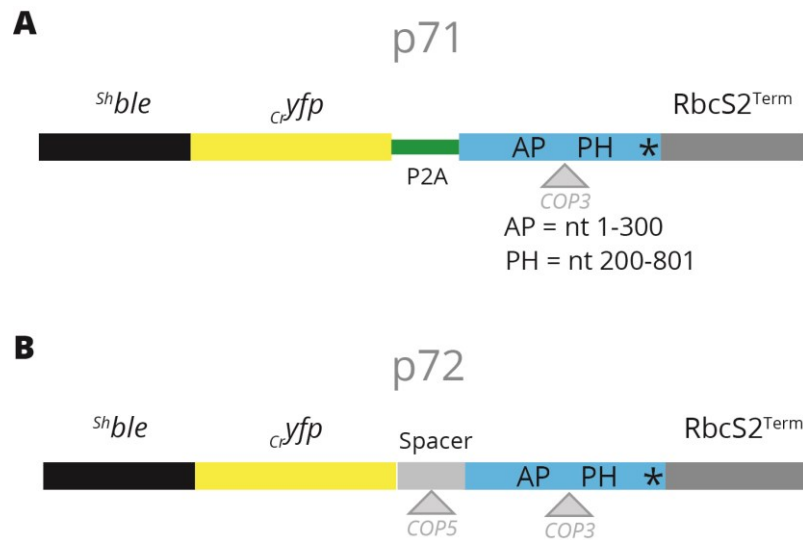
Zunächst sollte die neu hergestellte Modellkassette p70 (*shble::cypf::linker::aphVIII*(K45R)) in Stamm CC-503 getestet werden. Die Selektion erfolgte auf TAP-Agar mit 7,5 µg/ml zugesetztem Zeocin. Es konnte festgestellt werden, dass etwa fünfmal mehr Kolonien pro Transformation entstehen als zuvor mit dem p60-Konstrukt. 96 Kolonien wurden in einer Mikrotiterplatte kultiviert. Diese wurden dann Tröpfchenweise auf Agar-Platten mit steigender Paromomycin-Konzentration (Pm5, Pm10, Pm25; Angabe entspricht z.B.: Pm10 = Paromomycin 10 µg/ml usw.) transferiert. Etwa 20% der Klone zeigten kein Wachstum auf Pm5. 50% waren noch fähig auf Pm10 zu wachsen und circa 10% wuchsen noch auf Pm25. Für die Wahl geeigneter Modellstämme wurden zwei Klone gewählt, die Wachstum auf Pm10 zeigten, jedoch nicht auf Pm25. Kulturen dieser Stämme wurden synchronisiert und für die Transformation mit COP3-L1+COP3-R und dem Donor-Plasmid 3'  $\Delta$ 75 *aphVIII* verwendet. Es zeigte sich in den Kontrollen ohne Zugabe von Plasmiden, dass eine hohe Zahl an Kolonien auf Pm25 wachsen konnte. Da in den Vorexperimenten eine geringere Zahl an Zellen verwendet wurde, könnte die in den Transformationen um ein vielfaches höher verwendete Zellzahl zu diesem Ergebnis geführt haben.

Da die K45R-Mutation nicht wie erhofft verwendet werden kann, wird im nächsten Schritt die K45A-Variante getestet. Wie zuvor konnte leicht eine hohe Anzahl an Kolonien, durch Selektion auf Zeocin, generiert werden. Um die Inaktivierung des *aphVIII*-Markers durch die K45A-Mutation zu überprüfen, wurden die Stämme auf eine mögliche Paromomycin-Resistenz getestet. Keiner der Stämme zeigte jedoch ein Wachstum auf Pm10. Um eine mögliche Vorselektion der erhaltenen Stämme durchzuführen, wurden auch hierfür 96 Klone in Mikrotiterplatten angezüchtet und mikroskopisch auf Fluoreszenz des verwendeten YFP-Proteins getestet. Drei der isolierten Klone zeigten in der Tat die erwartete Fluoreszenz innerhalb des Zellkerns. Genauere Analysen dieser Stämme ergaben, dass es sich dabei um verkürzte Sequenzen handelt, die keine *aphVIII*-Sequenz am 3' Ende des Fusionsproteins enthalten.

Daher wurden 24 der Klone auf Vorhandensein der vollständigen Modellkassette getestet (ohne Promotor und Terminator). Zwei der untersuchten Stämme enthielten die komplette Sequenz und wurden, wie oben beschrieben, ebenfalls transformiert. Es zeigte sich in der Kontrolle mit Donor-Plasmid, dass eine Reparatur der K45A-Mutation auch ohne Verwendung der Nukleasen stattfinden kann. Daher war auch hier die Verwendung einer alleinigen Punktmutation nicht ausreichend, um ein verlässliches Selektionssystem zu erhalten.

---





**Abbildung 23** Schematische Darstellung der Modellkassetten p71 und p72

(A) p71: Eine P2A-Sequenz wurde als Linker zwischen *Cryfp* und *aphVIII* eingesetzt. Die Inaktivierung des *aphVIII* erfolgt durch Erzeugung einer 100 bp Überlappes. Zwischen die sich wiederholende Sequenz wurde die COP3-Zielsequenz inseriert.

(B) P72: Wie p71, lediglich die P2A-Sequenz wurde durch eine COP5-Zielsequenz ersetzt.

Studien in *A. thaliana* zeigten, dass es möglich ist, auch ohne eine Donor-DNA die Reparatur eines Markers durchzuführen (Puchta and Hohn, 2012). Hierzu wurden die Zielsequenzen der Nukleasen zwischen überlappende Sequenzen des Markers eingefügt. Durch einen von den Nukleasen eingefügten DNA-Doppelstrangbruch wird die homologe Rekombination der überlappenden Sequenzen stimuliert und so kann dessen Funktion wiederhergestellt werden. Analog zu diesem Ansatz wurde eine *aphVIII*-Sequenz hergestellt, die eine COP3-Zielsequenz enthält sowie 5' und 3' einen 100 bp Überlapp (Abbildung 23). Als Linker-Sequenz zwischen *cryfp* und *aphVIII* wurde die Zielsequenz von *Cop5* eingefügt. Da die bisherigen Versuche in motilen Stämmen zu keinem Resultat führten, wurde das erhaltene Plasmid p71 parallel in CC-503 und dem zuvor verwendeten Stamm CW15-302 getestet. Es zeigte sich, dass aus Transformationen mit p71 weniger Kolonien selektioniert werden konnten als zuvor mit p70. Es wurden jeweils zwei Modellstämme verwendet, deren Analyse eine vollständige Modellkassetten-Sequenz ergab. Die mit den ZFNs *COP3-L1* und *COP3-R* durchgeführten Transformationen der Modellstämme ergaben keine Pm-resistenten Kolonien.

Möglicherweise führte die geänderte *aphVIII*-Sequenz mit der eingeführten Wiederholung zu einer ungünstigen Faltung des Proteins. Dafür spricht ebenfalls die reduzierte Anzahl der erhaltenen Transformanten aus den Experimenten mit p71.

Um das Problem dieses möglichen Faltungsproblem es zu umgehen, können sogenannte „2A“-Peptide verwendet werden. Ähnlich der Funktion von „Internal Ribosom Entry Sites“ (IRES)

können durch Insertion der 2A-Sequenz zwei getrennte Proteine vom selben Transkript entstehen. Die vermutete Funktionsweise des 2A-Peptides ist hierbei ein „Ribosom hopping“. Hierbei wird durch die Struktur des 2A-Peptides das Ribosom zu einer fehlerhaften Peptidbindung gezwungen (Kim et al., 2011). Jedoch fällt das Ribosom nicht von der mRNA ab, sondern führt die Translation fort, wodurch zwei physisch getrennte Proteine entstehen. Der Vorteil zu den IRES liegt hierbei in der deutlich kürzeren Länge der 2A-Sequenzen.

Um diesen Ansatz in *Chlamydomonas* zu testen, wurde die *COP5*-Linkersequenz durch die eines P2A-Peptides ersetzt. In der Literatur sind verschiedene Varianten der 2A-Peptide beschrieben. Das hier verwendete P2A zeigte in der von Kim et al. durchgeführten Vergleichsstudien die höchste „cleavage“-Aktivität.

CC-503 und CW15-302 wurden mit dem neu hergestellten Testplasmid p71 (Abbildung 23) transformiert. Die Transformationseffizienz konnte durch die Verwendung des P2A-Peptides nur geringfügig gesteigert werden. Jedoch zeigten etwa 10% der selektionierten Stämme ein Fluoreszenzsignal innerhalb des Zellkernes. Dies konnte bei Versuchen mit p70 nicht detektiert werden. Von den so vorselektionierten Modellstämmen enthielt jeweils nur einer (~30%) die komplette Modellkassette. Die anschließend mit den ZFNs *COP3*-L1 und *COP3*-R durchgeführten Transformationen der Modellstämmen p71 ergaben keine Pm-resistenten Kolonien. Als positives Resultat konnte die in ihrer Häufigkeit deutlich erhöhte Frequenz von im Zellkern vorkommender Fluoreszenz festgestellt werden.

Daher sollte in der nächsten Versuchsreihe festgestellt werden, ob die Verwendung des P2A-Peptides in der bisher als einzig erfolgreich verwendeten Modellkassette des p60 Plasmids, eine Verbesserung darstellen könnte. Zudem sollte untersucht werden, ob die Verwendung von *cdyfp* anstelle von *cr:gfp* die Expression verbessert.

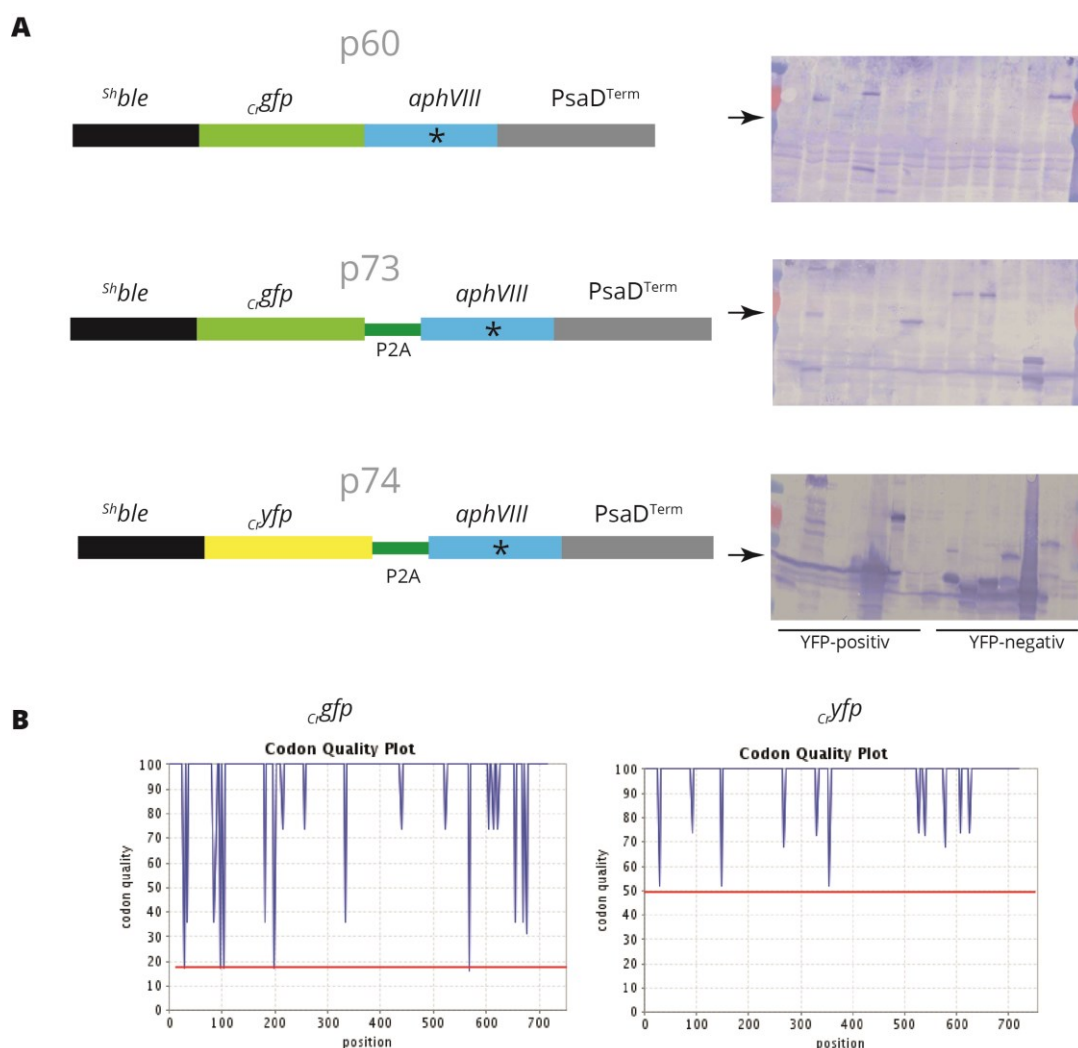


Abbildung 24 Schematische Darstellung und Vergleich p60, p73 und p74

(A) Vergleich der Proteinexpression der verwendeten Fusionsproteine. Für die Detektion der spezifischen Proteinbanden wurde ein Anti-ShBLE-Antikörper aus Kaninchen verwendet. P73 wie p60 außer P2A-Sequenz als Spacer zwischen *c<sub>gfp</sub>* und *aphVIII*. P74 wie p73 außer *c<sub>yfp</sub>* anstatt *c<sub>gfp</sub>*. Die Pfeile zeigen das zu erwartende Molekulargewicht der Fusionsproteine an. (B) Qualitative Analyse der in *c<sub>gfp</sub>* und *c<sub>yfp</sub>* verwendeten Codons. Da für alle Aminosäuren mehrere Codons verwendet werden können, ist hier die statistische Häufigkeit der tatsächlich verwendeten Codons angegeben.

Für diese vergleichenden Versuche wurde zunächst die Sequenz des P2A-Peptides zwischen die *c<sub>gfp</sub>*- und *aphVIII*-Sequenz in p60 eingefügt. Das so erhaltene Plasmid p73 ist identisch zu p74 außer, dass die *c<sub>gfp</sub>*-Sequenz durch die des codon-optimierten *c<sub>yfp</sub>* ersetzt wurde. Als Kontrolle wurde p60 erneut in Stamm CW15-302 transformiert. Für den Vergleich der Konstrukte p60 und p73 wurden nach der Selektion zufällig 12 Klone für eine Analyse mittels Westernblot ausgewählt. Für die Detektion spezifischer Banden konnte ein Anti-<sup>Sh</sup>BLE-Antiserum aus Kaninchen (Firma Cayla, Toulouse) verwendet werden. Wie in Abbildung 24 (rechts) zu sehen ist, gibt es keine Unterschiede der Expression von p60 und p73. Da Klone aus p73 Transformationen erstmals Fluoreszenz im Zellkern zeigten, wurden für die Western-Blot-Analysen sechs fluoreszente und sechs nicht-fluoreszente Klone verwendet. Alle fluoreszierenden Klone zeigten dabei eine

korrekte Bande (36 kDa) des zu erwartenden BLE:YFP-P2A-Fusionsproteins nach Abspaltung des APHVIII (Abbildung 24 A).

Aus den Analysen von p60 und p73 kann der Schluss gezogen werden, dass die Verwendung des P2A-Peptides alleine keine Verbesserung der Expression bewirken kann. Dies deutet darauf hin, dass die für *Chlamydomonas* optimierte GFP-Sequenz (Fuhrmann et al., 1999) erhebliche Probleme in der Translation verursacht, weshalb die im Anschluss angefügte P2A-Sequenz zu keiner Verbesserung mehr führen kann. Die Verwendung des ebenfalls für *C. reinhardtii* Codon-optimierten *crYfp* verbesserte die Expression. Eine Betrachtung der verwendeten Codons zeigte, dass im GFP trotz der Optimierung noch fünf Codons verwendet werden, welche lediglich eine Häufigkeit von 20% aufzeigen. Hingegen sind im optimierten *crYfp* nur Codons verwendet, die eine minimale Häufigkeit von 50% aufzeigen (Abbildung 24 B).

Aufgrund der zwischenzeitlichen Arbeiten am CRISPR-Cas9-System unterstützte Dr. Irina Sizova die Arbeiten am Modellsystem und nahm die Codon-Optimierung der in der Modellkassette verwendeten Sequenzen des *<sup>sh</sup>ble*-Markers und des *aphVIII*-Markers vor, die in p60, p73 und p74 noch nicht weiter optimiert waren.

Eine Betrachtung der Codon-Verteilung (Abbildung 25 C) der bisher verwendeten Marker zeigte, dass vor allem das verwendete *aphVIII* eine Vielzahl an schlechten Codons aufweist. Auch die verwendete *<sup>sh</sup>ble*-Markersequenz beinhaltet mehrere schlechte Codons, speziell zu Beginn der Sequenz (roter Rahmen). Daher wurden in einem ersten Schritt drei sehr selten vorkommende Codons mittels Mutagenese in der Sequenz ersetzt (Dr. Irina Sizova). Für eine spätere Verwendung wurde auch ein vollständig codon-optimiertes *crble2* hergestellt. Der Test wird nachgelagert erfolgen, da er nicht mehr Teil dieser Arbeit ist.

Die Optimierung der *aphVIII* Sequenz gestaltete sich hingegen schwieriger. Die in diesem Protein vorkommenden Aminosäuren sind zu einem hohen Prozentsatz von seltenen Codons codiert. Dies lässt eine Optimierung nur teilweise zu. Die Verwendung der am häufigsten vorkommenden Codons führt zu einem GC-Gehalt von 80- 85%. Da die Synthese einer Sequenz mit solch hohem GC-Gehalt schwer umsetzbar bis unmöglich ist, mussten einzelne Codons durch T/A-haltige ersetzt werden, um den GC-Gehalt zu senken und eine Synthese zu ermöglichen.

### 3. Ergebnisse

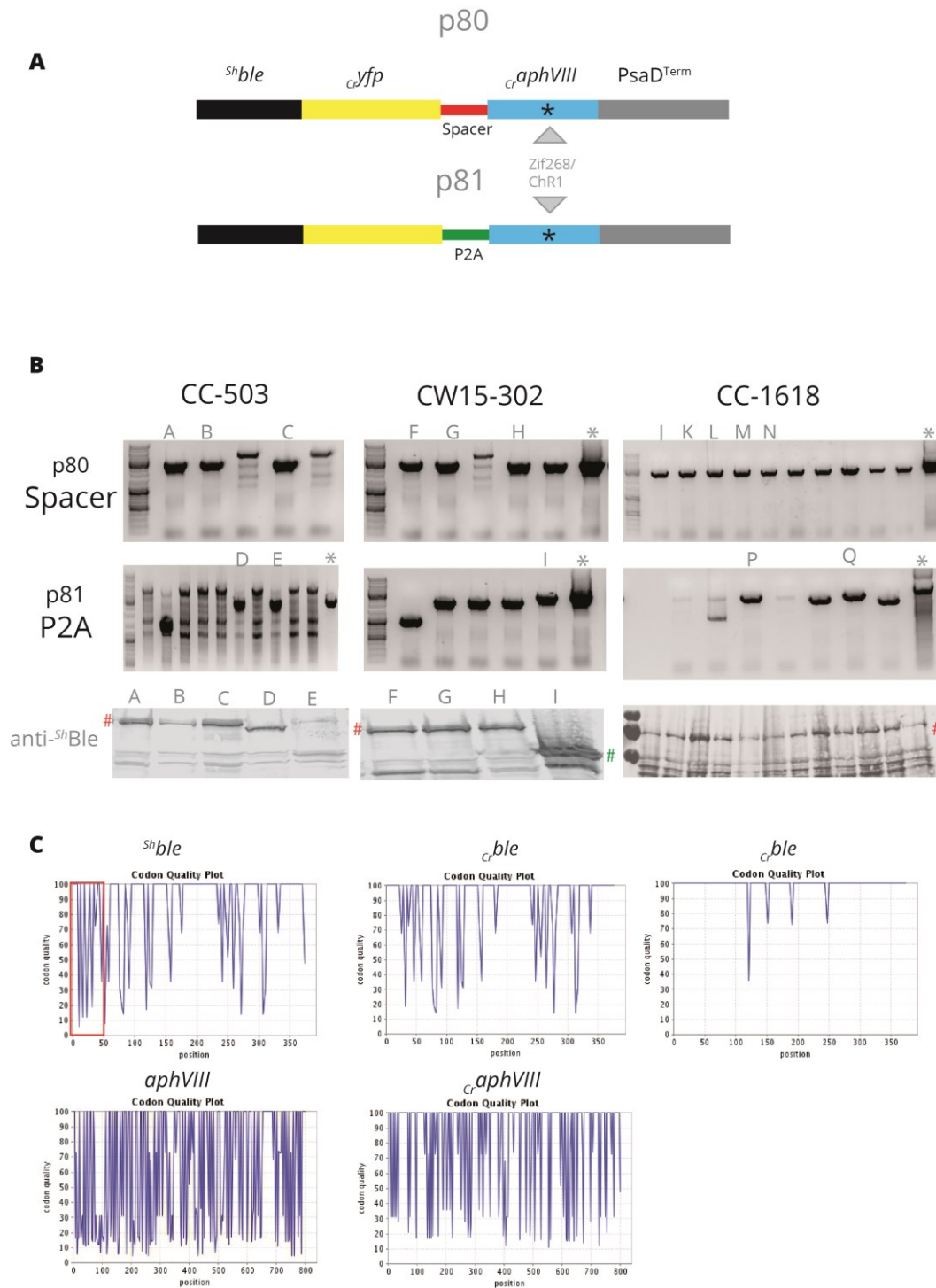


Abbildung 25 Schematische Darstellung der Modellkassetten p80 und p81

(A) Schematische Darstellung der Modellkassetten p80 und p81. Für Chlamydomonas codon-optimierte Sequenzen sind durch ein tiefgestelltes „Cr“ gekennzeichnet. In p80 verbindet eine Linker-Sequenz (Spacer) das Cryfp und das CraphVIII. In p81 hingegen wurde eine P2A-Sequenz als Linker verwendet. (B) PCR (oben) und Western-Blot-Analysen (unten) der mit p80 und p81 generierten Modellstämme. Die PCR-Kontrollen (Asterisk, grau) zeigen die zu erwartenden Fragmentgrößen. Für die Detektion des Fusionsproteins wurde ein Anti-ShBLE-Antikörper verwendet. Die zu erwartende Bandengrößen sind mit einem „#“ gekennzeichnet. (C) Analyse der Codon-Häufigkeiten. Für die Analyse wurde das Codon-Optimizer-Tool der Firma Geneart® (Invitrogen) verwendet.

Die derart optimierten Sequenzen der beiden verwendeten Marker konnten für zwei neue Modellplasmide verwendet werden (Abbildung 25 A). Um einen Vergleich mit den zuvor verwendeten Kassetten zu ermöglichen, wurde die Zif268/COP3-Zielsequenz in die *aphVIII*-Sequenz eingefügt. Zudem erfolgte ein Vergleich der Verwendung eines P2A-Peptides oder einer Linker-Sequenz zwischen *c<sub>ry</sub>fp* und *aphVIII*. Die beiden Testkassetten wurden in die Stämme CW15-302, CC-503 und CC-1618 transformiert. Aufgrund des funktionalen YFP-Fluoreszenzmarkers gelang es, für beide Testkassetten Klone anhand ihrer Fluoreszenzsignale vorzuselektieren. p80 zeigte in etwa 25% der analysierten Kolonien ein Fluoreszenzsignal, verteilt auf Cytoplasma und Nukleus. Circa 10% der p81-Kolonien fluoreszierten und zeigten ein deutliches Signal innerhalb des Nukleus.

Eine Analyse der genomischen Integration der Modellkassette mittels PCR zeigte, dass für p80<sup>Opt</sup>-Spacer etwa 75% der Klone die vollständige Testkassette integriert hatten. Das p81<sup>Opt</sup>-P2A Plasmid zeigte eine geringere Effizienz, weshalb in Stamm CC-503 eine Analyse zusätzlicher Klone erforderlich war, um eine vollständig integrierte Sequenz zu finden (2/15). Interessanterweise konnte in CC-1618 mit p80<sup>Opt</sup>-Spacer in allen 12 getesteten Klonen die vollständige Modellkassette amplifiziert werden. Hingegen enthielt nur einer der 12 analysierten p81<sup>Opt</sup>-P2A-Klone die vollständige Kassette (Abbildung 25 B). Die weitere Untersuchung der Proteinexpression anhand von Western-Blot-Analysen zeigte, dass fast alle der analysierten p80<sup>Opt</sup>-Spacer Klone ein einheitliches Expressionsmuster aufweisen. P81<sup>Opt</sup>-P2A zeigte nur in CW15-302 ein hohes Expressionslevel (Klon I; Abbildung 25 B) bei der zuvor berechneten Größe. Alle Klone des p80<sup>Opt</sup>-Spacer transformierten Stammes CC-1618 enthielten Fusionsproteine der richtigen Größe.

#### 3.2.3 p80- und p81-Modellstämme

Im nächsten Schritt wurden die neuen Modellstämme (MS) auf ihre Fähigkeit getestet, das defekte *aphVIII*-Markergen durch homologe Rekombination mit einer Donor-DNA zu reparieren. Für die codon-optimierte Modellkassette wurde auch eine Variante mit funktionalem *aphVIII* hergestellt (Dr. Irina Sizova). Dies diente zum einen als PCR-Template für die Herstellung einer neuen 5´deletierten Donor-DNA (pKS  $\Delta 100_{C_{aphVIII}}$ ) und zum anderen der Überprüfung der nötigen Paromomycin-Resistenz des BLE:YFP:APHVIII-Fusionsproteins. Dies geschah durch Transformation von Stamm CW15-302 mit p80-Spacer-WT und Selektion von Kolonien auf Zeocin. Die 24 erhaltenen Kolonien zeigten beim anschließenden Test auf ihre Resistenz gegen Paromomycin (10µg/ml) fast alle ein Wachstum auf selektivem TAP-Agar (persönliche Mitteilung Dr. Sizova).

Da erfahrungsgemäß die verschiedenen *Chlamydomonas*-Stämme unterschiedlich auf die nötige Applikation eines Hitzeschocks (HS) reagieren, fand in Vorversuchen mit den als Erstes generierten CC-503 Modellstämmen ein Test statt mit einer Verkürzung des Hitzeschocks. Transformationen von 503-P2A-E resultierten in einer gleichen Anzahl an Kolonien nach 15 oder 30 min Hitzeschock. Die durchgeführten Kontrollen ohne Nukleasen ergaben eine gleiche Anzahl von Kolonien. Dieselben Experimente mit Stamm 503-Spacer-A zeigten eine Vervierfachung der generierten Kolonien nach einem 30 min Hitzeschock. Dabei wurden mit ZFNs zweimal mehr Kolonien generiert als in der Kontrolle. Es bleibt festzuhalten, dass die hohe Anzahl an Kolonien in den Kontrollexperimenten keine klare Aussage zulassen über die Funktionalität der neuen Modellstämme bzw. der Modellkassette im Stamm CC-503 (Abbildung 26 A).

### 3. Ergebnisse

#### A

MS	ZFN	Donor-DNA	HS	CTRL	Kol	Trafos
503-P2A-E	COP3	ds $\Delta 100_{Cr aphVIII}$	15 min	350	350	4
503-P2A-E	COP3	ds $\Delta 100_{Cr aphVIII}$	30 min	350	350	4

503-Spacer-A	COP3	ds $\Delta 100_{Cr aphVIII}$	15min	10	25	4
503-Spacer-A	COP3	ds $\Delta 100_{Cr aphVIII}$	30 min	40	100	4

#### B

Modellstamm	ZFN	Donor-DNA	CTRL	Kol	Trafos
503-P2A-E	COP3	ds $\Delta 100_{Cr aphVIII}$	2000	2500	5
503-P2A-E	COP3	ssOligo100 $_{Cr aphVIII}$	2500	K	5

503-Spacer-A	COP3	ds $\Delta 100_{Cr aphVIII}$	130	90	5
503-Spacer-A	COP3	ssOligo100 $_{Cr aphVIII}$	50	150	5

CW15-302-P2A-I	COP3	ds $\Delta 100_{Cr aphVIII}$	0	0	5
CW15-302-P2A-I	COP3	ssOligo100 $_{Cr aphVIII}$	0	0	5

CW15-302-Spacer-H	COP3	ds $\Delta 100_{Cr aphVIII}$	0	0	5
CW15-302-Spacer-H	COP3	ssOligo100 $_{Cr aphVIII}$	0	0	5

#### C

Modellstamm	ZFN	Donor-DNA	CTRL	Kol	Trafos
CW15-302-Spacer-F	COP3	ds $\Delta 100_{Cr aphVIII}$	0	0	5
CW15-302-Spacer-G	COP3	ds $\Delta 100_{Cr aphVIII}$	0	0	5
CW15-302-Spacer-H	COP3	ds $\Delta 100_{Cr aphVIII}$	0	0	5
CW15-302-P2A-I	COP3	ds $\Delta 100_{Cr aphVIII}$	0	0	5
1618-Spacer-J	COP3	ds $\Delta 100_{Cr aphVIII}$	0	0	5
1618-Spacer-K	COP3	ds $\Delta 100_{Cr aphVIII}$	0	0	5
1618-Spacer-L	COP3	ds $\Delta 100_{Cr aphVIII}$	0	0	5
1618-Spacer-M	COP3	ds $\Delta 100_{Cr aphVIII}$	0	0	5
1618-Spacer-N	COP3	ds $\Delta 100_{Cr aphVIII}$	0	0	5
1618-Spacer-O	COP3	ds $\Delta 100_{Cr aphVIII}$	0	0	5
1618-P2A-P	COP3	ds $\Delta 100_{Cr aphVIII}$	0	0	5
1618-P2A-Q	COP3	ds $\Delta 100_{Cr aphVIII}$	0	0	5

Abbildung 26 Transformationen im Modellsystem p80 und p81

(A) Transformation der neuen Modellstämme im CC-503 Hintergrund mit unterschiedlich langer Applikation des Hitzeschocks (15 min oder 30 min). Die Kontrollen (CTRL) ohne Zugabe von ZFN-DNA ergaben eine hohe Anzahl an resistenten Kolonien

(B) Vergleich der Modellstämme im CC-503 oder CW15-302 Hintergrund. Für die Reparatur des defekten  $_{Cr aphVIII}$ -Markers erfolgte entweder die Zugabe von doppelsträngiger Plasmid DNA (ds $\Delta 100_{Cr aphVIII}$ ) oder einzelsträngiger DNA (ssOligo 100  $_{Cr aphVIII}$ ). Für die Erzeugung eines DSB wurden die COP3-ZFNs verwendet.

(C) Transformation weiterer p80- und p81-Teststämme im CW15-302 oder CC-1618 Hintergrund. In keinem der analysierten Stämme konnte eine Reparatur des  $_{Cr aphVIII}$ -Markers erzeugt werden.



### 3.3 CRISPR/Cas9

#### 3.3.1 Guide RNA

##### 3.3.1.1 Transkription der gRNA

Wie in der Einleitung beschrieben, müssen für die Verwendung des CRISPR-Systems in einem eukaryotischen Organismus verschiedene Anpassungen vorgenommen werden. Dazu gehört die Transkription der gRNA durch die RNA-Polymerase-III (RNAP III). Dies soll einen Export der gRNA aus dem Nukleus umgehen und eine korrekte gRNA-Sequenz gewährleisten ohne 5' oder 3' nicht-translatierende Sequenzen. Um einen geeigneten RNAP-III Promotor zu finden, wurde nach einem *Chlamydomonas* U6 Promotor gesucht. In der Literatur zu *C. reinhardtii* findet sich lediglich eine Studie (Jakab et al., 1997), die sich mit der U6 snRNA aus *Chlamydomonas* beschäftigt. Auf Grundlage dieser Untersuchung und der darin beschriebenen Sequenz der U6 snRNA wurde das *Chlamydomonas* Genom nach homologen Sequenzen durchsucht. Der durchgeführte BLASTN ergab wie in Abbildung 27 dargestellt, dass vier U6 snRNA Sequenzen im *Chlamydomonas* Genome vorhanden sind. Dies ist nicht ungewöhnlich, da derart wichtige Sequenzen, wie die U6-snRNA des Spleißapparates, oft in mehreren Kopien vorliegen. Drei der gefundenen Sequenzen befinden sich auf Chromosom 8. Eine Weitere konnte auf Chromosom 15 detektiert werden. Um die in anderen U6-Promotoren konservierten Elemente (PSE+TATA-Box) zu identifizieren, wurden die Sequenzen 1000 bp upstream und downstream der gefundenen U6 snRNAs miteinander verglichen. Dabei zeigte sich in drei der gefundenen Sequenzen eine Homologie 3' der U6 snRNA Sequenz. Im 5' - Bereich konnte die TATA-Box (Abbildung 27) identifiziert werden, das in vielen Organismen konservierte PSE-Element ist jedoch im *Chlamydomonas* U6 snRNA Promoter nicht vorhanden.

Da die gefundenen Promotoren keine wesentlichen Sequenzunterschiede zeigten, wurde zufällig eine der Sequenzen (Chromosom 8 - Treffer 1) für die Transkription der gRNA ausgewählt. Da aus der Sequenz, außer der TATA-Box, nicht ersichtlich war, welche Sequenzabschnitte für die Bindung der RNAP-III Transkriptionsfaktoren wichtig sind, wurden 1000bp 5' und 3' der U6 snRNA Sequenz verwendet. Sowohl zum Vergleich als auch für eventuelle Funktionalitätstests wurden ebenfalls bereits publizierte U6-Promotoren aus Reis (*Oryza sativa*) und Weizen (*Triticum aestivum*) (Jiang et al., 2013) getestet. Alle drei zu testenden Promotoren erhielten die gleiche gRNA Sequenz für die Transkription. Die Konstrukte wurden mittels Co-Transformation mit pUC7.8 in CC-1618 transformiert und auf Argininauxotrophie selektioniert.

### 3. Ergebnisse

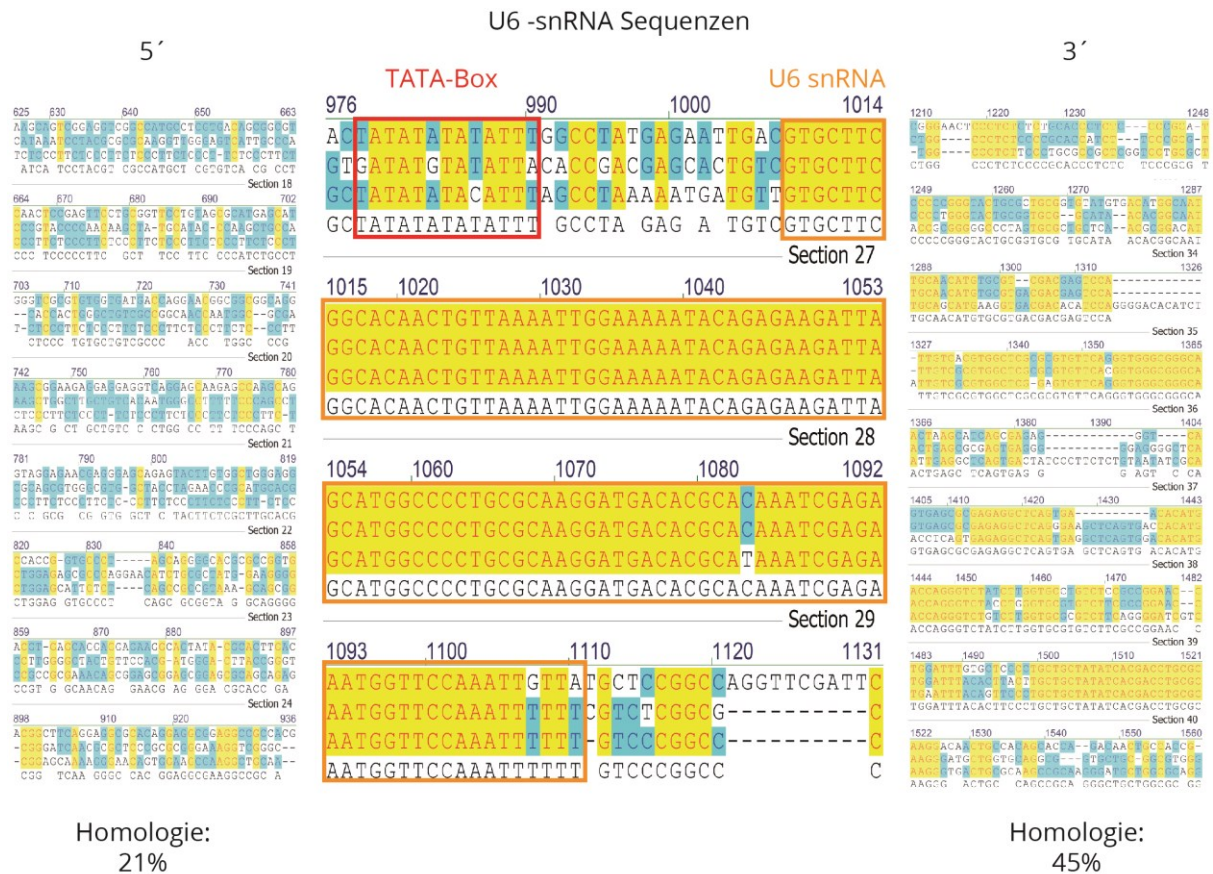


Abbildung 27 Homologien der chromosomalen U6-snrRNAs Sequenzen.

Allignement der in *C. reinhardtii* gefundenen U6-snrRNA-Sequenzen und der 5' und 3' gelegenen Regionen. Die U6-snrRNA-Sequenzen sind orange, die TATA-Box rot umrandet. Angabe der 5' und 3' Homologien in Prozent.

Für jedes der untersuchten Konstrukte wurden fünf positiv auf Integration der gRNA-Sequenzen getestete Klone analysiert. Aus diesen Klonen erfolgte die Isolation der Gesamt-RNA, welche mittels reverser Transkription für die Herstellung einer cDNA-Bibliothek verwendet werden konnte. Für die Amplifikation der gRNA Transkripte wurden spezifische Primerpaare in der qRT-PCR-Analyse verwendet. Als Standard zur Normalisierung der gemessenen Werte wurden Primerpaare für die Transkripte des  $\alpha$ -Tubulin eingesetzt. Die Auswertung der Ergebnisse der qRT-PCR Signale sind in Abbildung 28 dargestellt. Die höchste Transkriptionsrate erreichte mit 4716-fachem Wert ein Klon des U6 Promotors aus Weizen. In zwei der fünf gemessenen Klone konnte eine Transkription der gRNA detektiert werden, aber in allen fünf Klonen von U6-Reis und U6-*Chlamydomonas* wurden Transkripte nachgewiesen. Dabei zeigte U6-Reis eine etwas höhere Transkriptionsrate als U6-*Chlamydomonas*.

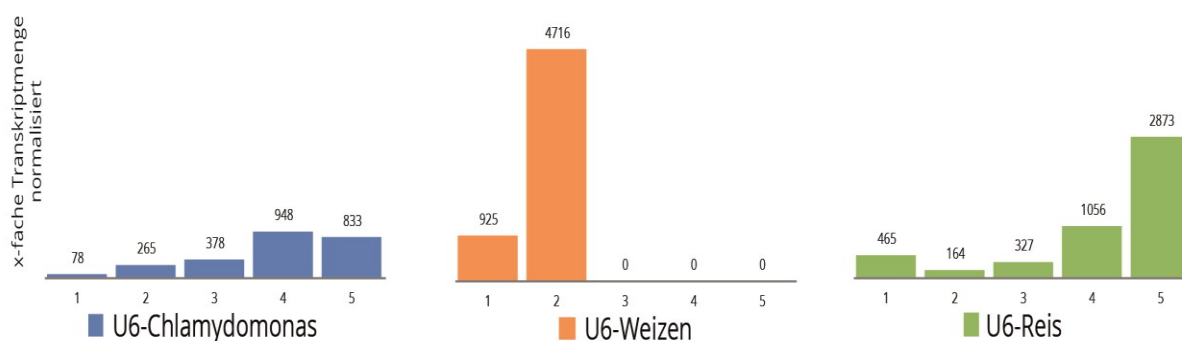


Abbildung 28 Nachweis der gRNA Transkription mittels qRT-PCR

Ergebnisse der quantitativen RT-PCR zur Ermittlung der U6-Promotoraktivität in *C. reinhardtii*. Für einen Vergleich der Transkriptmenge wurden die Signale normalisiert ( $\alpha$ -Tubulin).

#### 3.3.1.2 Klonierungsstrategien

Für die weitergehenden Versuche wurden zunächst zwei der in *Chlamydomonas* gefundenen U6 Promotoren verwendet (Chromosom 8–Treffer 1 „C1::“ und Chromosom 15–Treffer 1 – „C2::“). Der getestete *Chlamydomonas* U6-Promotor C1 wies eine mittlere Transkriptionseffizienz auf, wobei nicht bekannt war, welche Konzentration an gRNA Transkripten optimal für die Deletionsexperimente ist. Daher wurden zuerst die *Chlamydomonas* eigenen Promotoren verwendet und im weiteren Verlauf der Experimente auch der U6-Promotor aus Weizen. Weitere Analysen der Transkriptionsaktivität der verwendeten Promotoren folgen in diesem Kapitel. Da es bisher nur wenige Erkenntnisse über die Toxizität der Cas9 Nuklease gibt, sollten in weiteren Versuchen auch die Nickase Version der Cas9 Nuklease (Cas9N) verwendet werden. Durch Einführen der Mutation D10A kann eine der beiden Nukleasedomänen inaktiviert werden (Ran et al., 2013). Hierdurch wird erreicht, dass Cas9 nur einen Einzelstrangbruch verursacht. Ähnlich wie bei den Versuchen mit den ZFNs wird die Spezifität erhöht, da für einen DSB zwei Cas9N und zwei gRNAs benötigt werden. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass eine Distanz von 40 – 60bp ideal ist und die höchste Effizienz zeigte (Ran et al., 2013). Um eine einfache Änderung der Zielsequenzen zu ermöglichen, wurde ein Tandemvektor konstruiert, der es erlaubt, durch Hybridisierung zweier Primerpaare eine neue gRNA Zielsequenz zu integrieren. Da für die Cas9N-Versuche zwei unterschiedliche gRNAs benötigt werden, können in diesem Vektor sequenziell zwei gRNA Zielsequenzen eingebaut werden (Abbildung 29 A). Durch die Verwendung von Typ-II-S Restriktionsenzymen (hier: BbsI und BsmBI), welche außerhalb ihrer Erkennungssequenz schneiden, ist es möglich die Ligation und Restriktion im gleichen Ansatz durchzuführen (Kabadi et al., 2014).

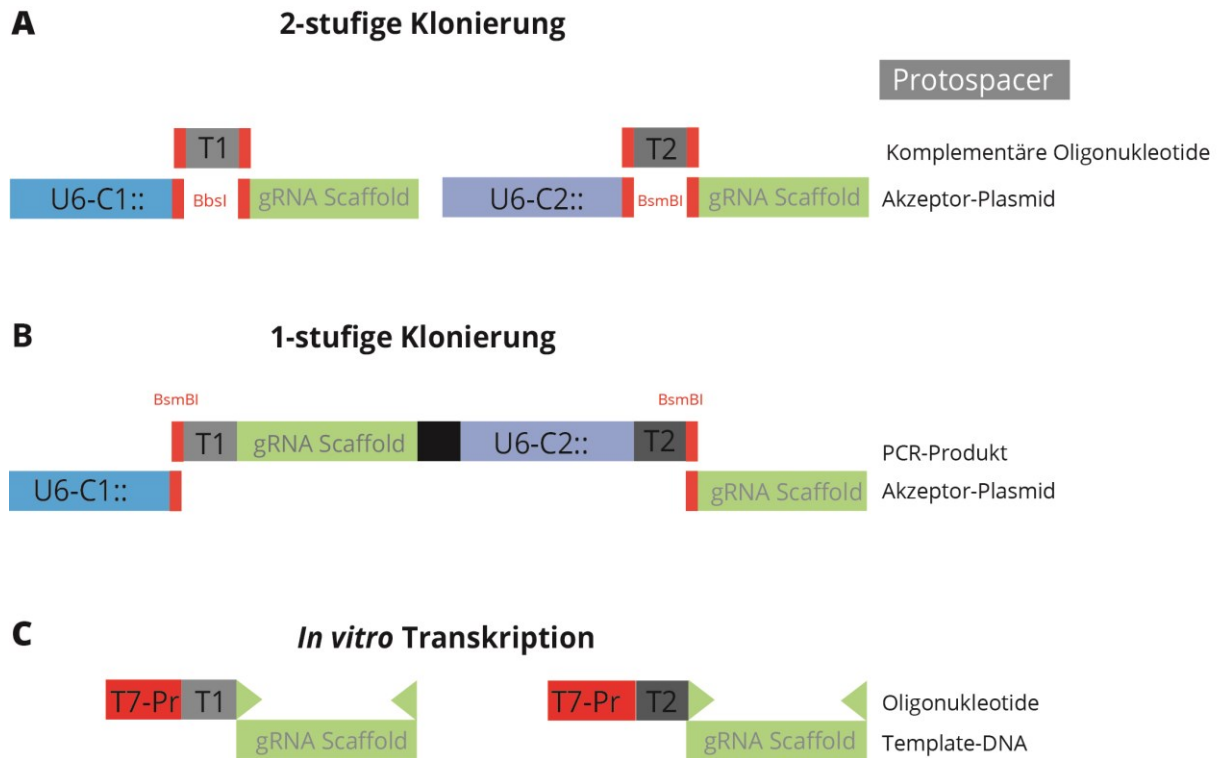


Abbildung 29 Klonierungsstrategien

(A) Für diese Klonierungsstrategie wurden zwei Kassetten für die Transkription der gRNA in einen Vektor kloniert. Für die Insertion der Protospacer wurde eine Spacer-Sequenz eingesetzt, welche zwei BbsI- oder BsmBI-Schnittstellen enthalten. Der Restriktionsverdau mit einem dieser Enzyme generiert spezifische 4 bp Überhänge. Für die Insertion der Protospacer-Sequenz werden zwei Oligonukleotide verwendet, die nach Hybridisierung die zu den Überhängen komplementären Sequenzen bilden. Die Ligation und Restriktion können in einem Ansatz durchgeführt werden, da die Restriktionsschnittstellen durch die Nukleasen vom Plasmid entfernt werden. In einem zweiten Schritt erfolgt die Integration des zweiten Protospacers (T2). (B) Bei dieser Strategie wird ein PCR-Produkt hergestellt, welches 5' und 3' die Protospacer-Sequenzen enthält, gefolgt von einer BsmBI-Schnittstelle an den Termini. Wie in (A) kann Ligation und Restriktion in einem Ansatz durchgeführt werden. Nach erfolgreicher Integration des PCR-Produktes in das Akzeptor-Plasmid entstehen zwei Transkriptionseinheiten für die gRNA Herstellung. (C) Um *in vitro* gRNA zu synthetisieren, wurde ein langer Primer verwendet, der eine T7-Promotorsequenz, die Protospacer-Sequenz und einen Überlapp zum Template enthält. Als Template diente eine Sequenz, die den gRNA-Scaffold enthält. Der reverse Primer beginnt am 3' Ende der Scaffold-Sequenz.

Für die Ligationsreaktion wurden die hybridisierten Primer so gewählt, dass zwei 5' Überhänge entstehen, die exakt mit den von den Typ-II-S Restriktionsendonukleasen verursachten Überhängen hybridisieren können. Um eine noch schnellere und effizientere Klonierung der gRNAs zu ermöglichen, wurde eine weitere Klonierungsstrategie angewandt. Aufbauend auf dem Prinzip der Typ-II-S Restriktion wurde ein Fragment synthetisch hergestellt (gBlock, IDT-DNA) und blunt in pBluescript KS- kloniert. Das Fragment enthält zwischen dem U6 Promoter aus Weizen und dem gRNA-Scaffold zwei BsmBI-Schnittstellen (Abbildung 29 B). Die Erkennungssequenzen von BsmBI (rot) sind dabei wieder so gerichtet, dass sich diese selbst aus dem Plasmid herausschneiden und ein spezifischer vier Nukleotide langer Überlapp entsteht. Ein weiteres Fragment, das als PCR-Template dient, enthält einen gRNA-Scaffold, gefolgt von einer kurzen Spacer-Sequenz und einem weiteren darauffolgenden U6-Promoter. Hiermit können mittels PCR-Primern die beiden Zielsequenzen (grau) und zwei BsmBI-Schnittstellen angefügt werden. Wie in

der vorherigen Klonierungsstrategie wird die Restriktion und Ligation in einem Ansatz durchgeführt. Der Vorteil der zweiten hier beschriebenen Strategie liegt darin, dass lediglich ein Klonierungsschritt nötig ist und somit zusätzlicher Zeit- und Sequenzieraufwand vermieden wird.

Zu einem späteren Zeitpunkt wurde auch *in vitro* hergestellte RNA verwendet. Hierfür wurde die gRNA Scaffold Sequenz als Template verwendet. Mittels langer Primer konnte dann ein PCR-Produkt hergestellt werden mit einer T7-Promotor Sequenz, dem 20 bp Protospacer und dem gRNA Scaffold. Für die *in vitro* Transkription wurde das Maxiscript T7-Kit (Life Technologies) verwendet, welches für die Herstellung von RNA ohne 5' CAP geeignet ist (Abbildung 29 C).

### 3.3.1.3 U6-Promotoren

Für die oben gezeigten Experimente wurden verkürzte Versionen des zuvor getesteten U6-C1 Promoters und ein bisher nicht getesteter U6-Promoter (U6-C2) verwendet. Da die in der Literatur beschriebenen U6-Promotoren nur 5´ der zu transkribierenden Sequenz Motive für die Bindung der RNAP-III enthielten, wurden in diesen Versionen die 3´ Sequenzen weggelassen. Für jede der verwendeten gRNAs wurden drei Klone gewählt, die zuvor mittels PCR auf die genomische Integration von pAG-PT1 und pAG-PT2 getestet wurden. Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse der qRT-PCR-Analysen (Dr. Lina Sciesielski). Der Promoter aus Chromosom 15 (U6-C15) zeigte nur eine basale Transkriptionsaktivität, während U6-C1 auch in der verkürzten Version eine Transkriptionseffizienz vergleichbar mit der zuvor in Abschnitt 3.3.1.1 gemessenen Aktivität aufwies. Daher scheint U6-C2 nicht geeignet für weiterführende Versuche. Die basale Aktivität kann durch die TATA-Box hervorgerufen werden, was in der Literatur beschrieben ist (Zhu et al., 1995). Aber auch U6-C1 zeigte nur in zwei der sechs untersuchten Klone eine hohe Transkriptionsrate. Möglicherweise sind hierfür Positionseffekte innerhalb des Genoms verantwortlich.

Tabelle 3 Analyse U6 verkürzt

Wie zuvor für die verlängerten U6-Promotoren (inkl. 1000 bp in 3´ Richtung), fand eine Analyse der verkürzten U6-Promotoren (ohne 3´ Sequenzen) durch quantitative RT-PCR statt. Klone wurden mittels PCR auf Integration der U6-Konstrukte getestet. Positive Klone dienten dann zur Analyse der Promotoraktivität. Für die Vergleiche der Transkriptmengen wurden die Daten auf  $\beta$ -Actin mRNA-Menge normalisiert.

	Klon	gRNA	x-fach
	302 WT	-	1
C1::PT1-1	1	-	1
	2	+	149
	3	-	1
C2::PT1-2	1	-	1
	2	+	9765
	3	-	1
C1::PT2-1	1	(+)	54
	2	-	1
	3	(+)	9
C2::PT2-2	1	+	21
	2	-	1
	3	+	1336

### 3.3.2 Expression von Cas9 und Lokalisation im Nukleus

#### 3.3.2.1 Konstitutive Expression von Cas9

Zu Beginn der Versuche mit Cas9 wurde versucht, einen Modellstamm zu generieren, der konstitutiv die Cas9-Nuklease exprimiert. Die Generierung eines solchen Stammes hätte den Vorteil, dass in weiteren Experimenten lediglich die Transformation einer gRNA und möglicherweise eines Insertions/Deletions-Templates erforderlich wäre. Zudem ermöglicht es, verschieden Gene mittels dieses Expressionstammes als Ziele zu verwenden. Für die Expression von Cas9 wurde die von Le Cong et. al (Cong et al., 2013) publizierte Proteinsequenz in eine *Chlamydomonas* codon-optimierte (Genscript) DNA-Sequenz übersetzt. Zusätzlich zur Sequenz von Cas9 enthielt die Sequenz N- und C-terminal eine Kernlokalisationssequenz (NLS), am N-Terminus folgt dem NLS eine 3-fache FLAG-Tag Sequenz.

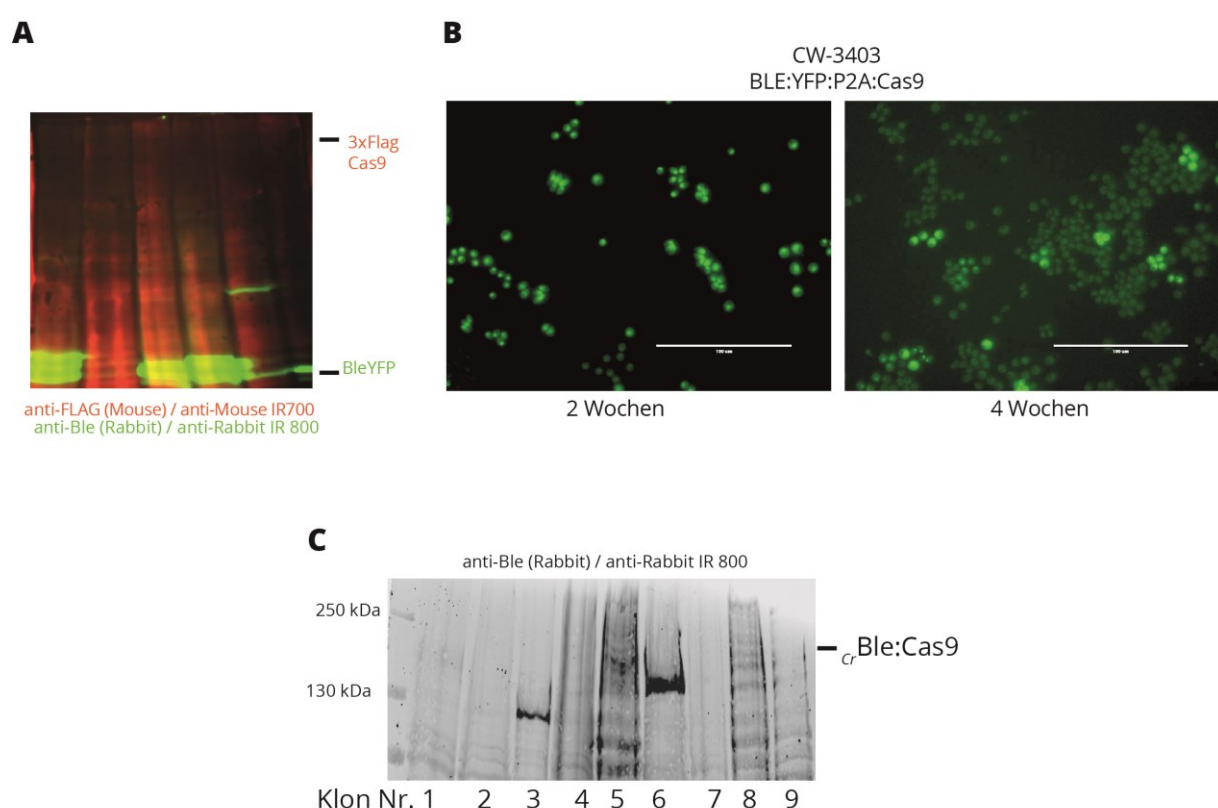
Da das Klonieren der Cas9 Sequenz in den Expressionsvektor pIS105-Arg7 nicht realisierbar war, vermutlich aufgrund einer zu großen Gesamtgröße des Plasmides von 14 kbp, wurde die Cas9 Sequenz zuerst in pIS105 hinter den HR-Promoter kloniert, um später mit pUC7.8 (Arg7) cotransformiert zu werden. Kolonien aus diesen Experimenten wurden in Mikrotiterplatten kultiviert und dann anhand von Western Blot Analysen charakterisiert. Leider konnte in keinem der analysierten Klone ein Signal des anti-Flag Antikörpers detektiert werden (Abbildung 30 A). Das verwendete Antiserum verursacht unspezifische Signale und das Fehlen einer Positivkontrolle erschwerte das Auswerten der detektierten Signale. Da in keinem der analysierten Klone ein Signal des anti-Flag Antikörpers detektiert werden konnte, wurde diese Strategie nicht weiter verfolgt.

Die nächste Versuchsreihe beruht auf den Erfahrungen mit der Arbeit zur Verbesserung des Modellsystems (3.2.1). Die vorherigen Experimente verhalfen nicht zur gewünschten Vorauswahl möglicher positiver Kolonien. Die Cotransformation mit Arg7 erlaubt auch keinen Rückschluss über ein mögliches Expressionlevel des cotransformierten Cas9-Konstruktes.

Aus diesem Grund wurde auf das *crble<sub>cr</sub>yfp*-p2a-Konstrukt zurückgegriffen. Im Falle der Modellkassetten gelang es, durch die Verwendung dieses Konstruktes eine einfach Vorselektion am Mikroskop durchzuführen, da das BLE:YFP einfach im Kern detektiert werden kann. Das darauf folgende inaktivierte *aphVIII* wurde in diesem Fall durch die Cas9-Nuklease ersetzt. Zwar konnten mit dem *crble<sub>cr</sub>yfp*-Spacer-Konstrukt mehr Klone generiert werden, es war jedoch nicht bekannt, ob ein großes N-terminales Fusionsprotein (BLE:YFP) die Cas9-Aktivität inhibieren könnte. Da die Cas9-Nuklease mit ca. 165 kDa ein für *Chlamydomonas* Verhältnisse großes und



möglicherweise schwer zu exprimierendes Protein darstellt, weshalb auch die Detektion per Western-Blot problematisch sein könnte, wurde in diesem Ansatz auch ein möglicher funktionaler Assay angestrebt. Die weiteren Arbeiten zielten darauf, in einem ersten Schritt *PsaD::BY2C* in *C. reinhardtii* zu transformieren und Klone durch YFP-Fluoreszenz zu selektionieren, die möglicherweise ebenfalls die Cas9-Nuklease exprimieren. Im zweiten Schritt sollte dann durch Transformation dieser Klone mit einer gRNA gegen die YFP-Sequenz die Fluoreszenz wieder abgeschaltet werden. Dieser Ansatz birgt den Vorteil, dass die Expression der Cas9-Nuklease nach erfolgter Mutation im YFP dadurch gestoppt würde. Somit könnte ein möglicher mutagener Langzeiteffekt durch simultane Expression von gRNA und Cas9 verhindert werden.



**Abbildung 30** Analysen der heterologen Expression von Cas9 in *C. reinhardtii*

**(A)** Western-Blot-Analyse (Falschfarben-Darstellung): Fluoreszierende Kolonien des Stammes CW3403 nach Transformation mit pBY2C. Für die Detektion des BLE:YFP-P2A-Fragments wurde ein Anti-<sup>Sh</sup>BLE-Antiserum (Rabbit; 1:2000) verwendet. Für eine mögliche Detektion von Cas9, welches N-terminal ein 3xFLAG-Tag besitzt, wurde ein Anti-Flag-Antiserum (Mouse; 1:500) benutzt. Die Verwendung, infrarot fluoreszierender, sekundärer Antikörper (IR-700-anti-Mouse; IR-800-anti-Rabbit beide 1:3000) ermöglicht die parallele Detektion der Signale. Signaldetektion: Li-cor Scanner (Odyssey). **(B)** Fluoreszierende CW3403-BY2C Kolonien zeigen bereits nach 4 Wochen ein stark reduziertes Fluoreszenzsignal. **(C)** Western-Blot-Analyse der BLE:Cas9-Fusionsproteine. In einer Vorselektion wurden neun Klone ausgewählt, die möglicherweise ein korrektes Fusionsprotein exprimieren. Diese wurden hier erneut in einem weiteren Blot analysiert. Das BLE:Cas9-Fusionsprotein hat ein berechnetes Molekulargewicht von 185 kDa. Klon 4 zeigt ein Signal bei 130 kDa. Die Klone 5 und 8 zeigen ein fragmentiertes Bandenmuster. Klon 6 zeigt ein starkes Signal bei der zu erwartenden Größe.



Nach erfolgreicher Transformation von Stamm CW3403 mit dem Plasmid pBY2C konnten, wie erhofft, Klone anhand ihres Fluoreszenzsignals vorselektiert werden. Western-Blot-Analysen dieser Klone (Abbildung 30 A, Exemplarisch) zeigten ein starkes Signal des BLE:YFP-Fusionsproteins bei 36 kDa (grün). Ein 3xFLAG-Cas9 Signal wäre bei ca.150 kDa zu erwarten gewesen. Hierbei konnte in keinem der vorselektierten Klone ein spezifisches Signal detektiert werden.

Da durchaus eine sehr geringe Menge an Cas9 für die Deletionsexperimente ausreichend sein kann, wurden acht der vorselektionierten Stämme mit C1::gYFP transformiert. Von jedem dieser Stämme wurden 48 der erhaltenen Kolonien gepickt und in Mikrotiterplatten kultiviert. Erste mikroskopische Analysen zeigten in etwa 10% der Klone ein vollkommenes Fehlen der Fluoreszenz. Etwa weitere 10-15% zeigten ein Mosaikverhalten, also eine graduelle Abnahme der Fluoreszenz innerhalb des selektierten Stammes. Wie sich später zeigte, war dies allerdings in den untransformierten Modellstämmen nach 4 Wochen ebenfalls zu sehen (Abbildung 30, rechts). Es wurden einige der Stämme, welche mit C1::gYFP transformiert wurden und überhaupt keine Fluoreszenz mehr zeigten weiter analysiert. Auf zuvor extrahierter genomischer DNA wurde die Sequenz des *c<sub>l</sub>yfp* amplifiziert und die erhaltenen Fragmente anschließend sequenziert. Die Auswertung der Sequenziererergebnisse ergab keine induzierte Mutation innerhalb der Zielsequenz. Infolgedessen lässt sich der Verlust des Fluoreszenzsignals auf epigenetisches Silencing zurückführen.

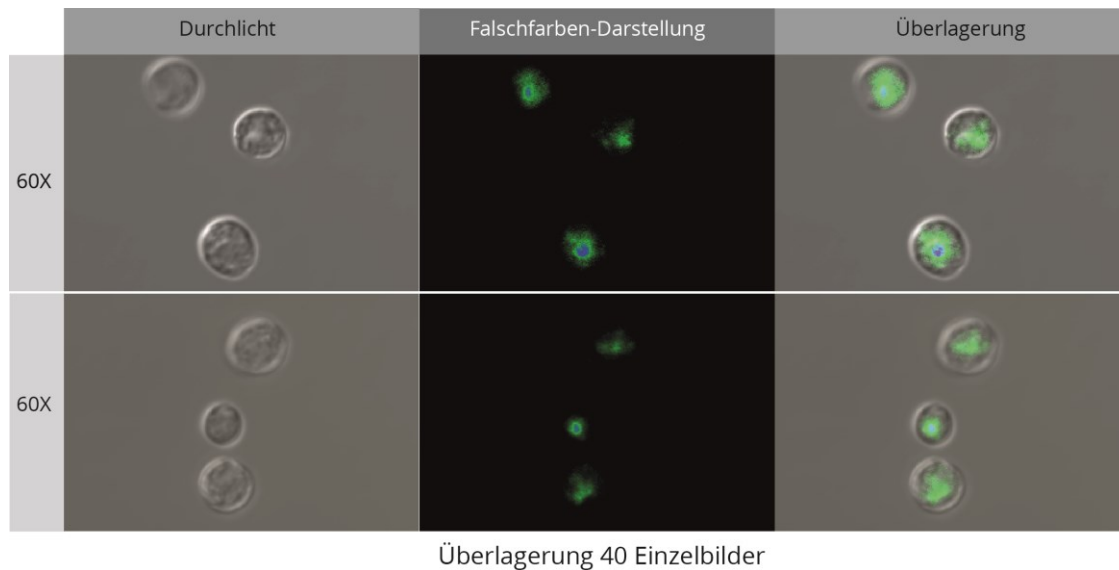
Aufgrund der bisher erfolglosen Versuche, ein Fusionsprotein mit integriertem P2A-Peptid zu exprimieren, wurde in einem weiteren Versuch eine direkte Fusion des BLE-Markers mit Cas9 angestrebt. Während der Arbeiten am Modellsystem und der in diesem Zusammenhang erfolgten Codon-Optimierung des *<sup>Sh</sup>ble*-Markers konnten gute Ergebnisse mit der *c<sub>l</sub>ble*-Version erzielt werden. Die Cas9-Sequenz wurde 3' an das optimierte *c<sub>l</sub>ble* eingefügt und das erhaltene Plasmid *p<sub>c<sub>l</sub>ble</sub>:Cas9* in Stamm CW15-302 transformiert. In einem ersten Screening mittels Western-Blot-Analysen konnte in 9 von 40 Klonen ein Signal detektiert werden, welches dem zu erwartenden Molekulargewicht von 185 kDa des Fusionsproteins entsprach. In einer weiteren PAGE-Analyse und dem darauf folgenden Western-Blot konnten mit dem verwendeten anti-*<sup>Sh</sup>BLE*-Antiserum Banden detektiert werden, welche dem berechneten Molekulargewicht entsprachen. Für weitere Analysen und Experimenten mit gRNAs wurden die Klone 3, 5, 6 und 8 ausgewählt. Das aus Klon 3 detektierte Signal des Fusionsproteins lag bei etwa 130 kDa und damit etwas unterhalb der erwarteten 185 kDa. Da aber durch post-translationale Modifikationen, wie Phosphorylierungen oder Glycosylierungen, ein verändertes Laufverhalten während der PAGE auftreten kann, sollte auch dieser Klon im Weiteren verwendet werden. Das Bandenmuster der Klone 4 und 8, ist sehr fragmentiert, was jedoch bei einem derart großen Fusionsprotein nicht

ungewöhnlich ist, daher finden auch mit diesen Stämmen weiterführende Experimente statt. Klon 6 zeigte das stärkste Signal bei dieser Analyse, wobei das detektierte Signal dem berechneten Molekulargewicht entspricht. Die hier beschriebenen Expressionsversuche fanden zum Ende der Laborarbeiten statt, die im Folgenden beschriebenen Arbeiten fanden daher zu einem früheren Zeitpunkt statt.

#### 3.3.2.2 Kernlokalisation

Da die bisherigen Versuche nicht zum gewünschten Ergebnis einer Western-Blot-Detektion von Cas9 führten und ein funktionaler Nachweis nicht das erhoffte Ergebnis brachte, wurde fortan der Ansatz verfolgt, durch Fusion eines C-terminalen YFP-Fluoreszenzmarkers eine mikroskopische Kernlokalisation zu ermöglichen. Dabei wurden, wie auch bei allen anderen hier beschriebenen Cas9-Konstrukten, ein Kernlokalisationssignal (NLS) an das Cas9:YFP-Fusionsprotein N- und C-terminal angefügt. Dabei handelt es sich N-terminal um das bereits für die ZFNs verwendete SV40-NLS. C-terminal wurde das von Cong et al. (Cong et al., 2013) verwendete NLS beibehalten. Für die Expression wurden zwei unterschiedliche Konstrukte hergestellt, ein *<sup>Sh</sup>ble:p2a:crCas9:cyfp* (B2CY) Konstrukt und ein *Cas9:yfp:p2a:aphVIII* (CY2A). Zwischenzeitliche Arbeiten der Arbeitsgruppe von Prof. Feng Zhang ergaben, dass es für die Kernlokalisation von Cas9 von Vorteil ist, wenn gleichzeitig eine gRNA vorliegt, obwohl allgemein davon ausgegangen wird, dass die gRNA den Kern gar nicht verlässt. Die genauen Gründe dafür sind noch nicht bekannt in bislang noch nicht publizierten Arbeiten derselben Gruppe konnte gezeigt werden, dass ein C-terminales GFP/YFP die Nuklease-Funktion von Cas9 nicht inhibiert (persönliche Mitteilung Prof. Zhang). Aus den Transformationen mit B2CY und der Selektion auf Zeocin (5–10 µg/ml TAP-Agar) resultierten nur sehr wenige Kolonien. Im Gegensatz dazu konnten mit CY2A wiederholt gute Transformationsergebnisse (20–30 Kolonien/Transformation) erzielt werden. Daher wurden die weiteren Arbeiten aufgrund der besseren Transformationseffizienz mit CY2A durchgeführt.

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 31 Kernlokalisierung von Cas9YFP**

Konfokale-Laserscanmikroskopie (CLSM; Firma Zeiss) der CC-1618-CY2A Klone. Für die Detektion des YFP-Signals wurde eine mittlere Scanzeit von 8µs gewählt sowie eine niedrige Laserintensität (3%). Dies diente dazu, eine Autofluoreszenz des Chloroplasts zu vermeiden. Es konnten nur in wenigen analysierten Klonen ein schwaches Signal detektiert werden. Die Überlagerung von 40 Einzelaufnahmen führte zu einer besseren Bildgebung. Falschfarben-Darstellung (steigende Intensität von grün nach blau). Eine Überlagerung der Falschfarben-Darstellung mit der Durchlicht-Aufnahme zeigt Cas9:YFP hauptsächlich im Zytoplasma, es konnten jedoch auch Akkumulationen im Zellkern beobachtet werden.

CY2A // C1::gCop5 wurde in Stamm CC-1618 transformiert und auf 1µg/ml Paromomycin TAP-Agar selektiert. Die erhaltenen Klone wurden wieder in Mikrotiterplatten kultiviert und direkt für die Konfokale-Mikroskopie verwendet. In Einzelaufnahmen konnte keine klare Lokalisation von Cas9:YFP festgestellt werden. Bei schwach exprimierenden Proteinen kann normalerweise die Intensität der Anregungswellenlänge erhöht werden. In *Chlamydomonas* führt jedoch die Absorption der Chlorophylle oftmals zu unerwünschter Hintergrundfluoreszenz des Chloroplasts oder von Photopigmenten innerhalb des Zellkörpers, weshalb hier mit relativ niedrigen Intensitäten und mittleren Scanzeiten gearbeitet wurde. Für die Lokalisation wurden 40 Einzelaufnahmen in einem Stack überlagert. Die Signale wurden soweit gefiltert, dass keine Hintergrundfluoreszenz mehr erkennbar ist. Abbildung 31 zeigt die gelungene Detektion von Signalen innerhalb des Cytosols und des Nukleus. In der Falschfarbendarstellung ist auch deutlich eine erhöhte Intensität (blau) innerhalb des runden Zellkerns zu erkennen. Wichtig ist anzumerken, dass keine Autofluoreszenz des umgebenden Chlorophylls detektiert wurde. Somit konnte gezeigt werden, dass eine, wenn auch schwache, Expression von Cas9:YFP möglich ist und dieses teilweise im Nukleus vorliegt. Eine weitere Analyse dieser Klone durch Western-Blotting konnte aufgrund des schlechten Signalrauschverhältnisses des Anti-FLAG-Antikörpers nicht durchgeführt werden. Die zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführten Versuche zur Expression des <sub>cr</sub>BLE:Cas9-Fusionsproteins (Abbildung 30 C) legen jedoch nahe, dass die hier detektierten Signale echt sind.

#### 3.3.2.3 Deletionsexperimente

Da nun dank der Kernlokalisation die Grundlagen für ein erfolgreiches Gendeletionsexperiment geschaffen waren, sollte versucht werden, in Stamm CW15-302 eine Mutation innerhalb des Phototropin-Genes zu erzeugen, um dies später in einem motilen Stamm zu wiederholen. Dies wäre für die weitere Analyse der PHOT-Funktion in *Chlamydomonas* wichtig, um auch die Prozesse innerhalb der Flagellen besser verstehen zu können. Ein weiterer Pluspunkt war auch der sehr gute polyklonale Antikörper (anti-LOV1), der für Westernblot-Analysen verwendet werden konnte. Zunächst wurden Zielsequenzen für die gRNAs innerhalb der *PHOT*-Sequenz gesucht. Der erste Zielabschnitt (PT1) liegt innerhalb des Exons 2, wobei die beiden gRNA Sequenzen PT1-1 (5´ GGTCCGTGCCCTCGCCTTGG 3´) und PT1-2 (5´ GATCAGGGACGCCATCAAGA 3´) einen Abstand von 20bp haben. Der zweite Zielabschnitt (PT2) liegt innerhalb des Exons 3, wobei gRNA PT2-1 (5´ GTTCTGCTGGATGCGCTCCA 3´) und gRNA PT2-2 (5´ GTTCGCCTCCGACGCCTTCC 3´) einen Abstand von 41bp aufweisen.

Wie in einer Vielzahl an Publikationen beschrieben (Jiang et al., 2013; Mali et al., 2013; Kabadi et al., 2014), führt die Anwendung des CRISPR/Cas9-Systems zu Insertionen oder Deletionen (InDels) innerhalb der Zielsequenz. Um eine Detektion von InDel-Mutationen zu ermöglichen, werden häufig sogenannte Mismatch-Nukleasen verwendet. Der Zielabschnitt, in welchem Cas9 eine Mutation möglicherweise verursacht hat, wird mittels PCR vervielfacht. Im nächsten Schritt werden diese Fragmente mit PCR-Fragmenten des Wildtyp-Allels gemischt. Enthalten die Klon-Fragmente InDels, entstehen durch Erhitzen und Rehybridisieren mit den wildtypischen-Fragmenten fehlerhafte Basenpaarungen, welche von der Mismatch-Nuklease als Substrat erkannt werden. Daraufhin erzeugt die Nuklease einen DNA-Doppelstrangbruch und generiert Fragmente, welche durch eine DNA-Elektrophorese detektiert werden können.

Für diesen Versuch ist es wichtig, unspezifische PCR-Amplifikate zu vermeiden. Daher erfolgte zunächst eine Optimierung der PCR-Bedingungen und Primerkombinationen für die auf dem Exon 4 liegenden Zielsequenzen PT1 und PT2 des Phototropin-Gens (Abbildung 32 A + B).

### 3. Ergebnisse

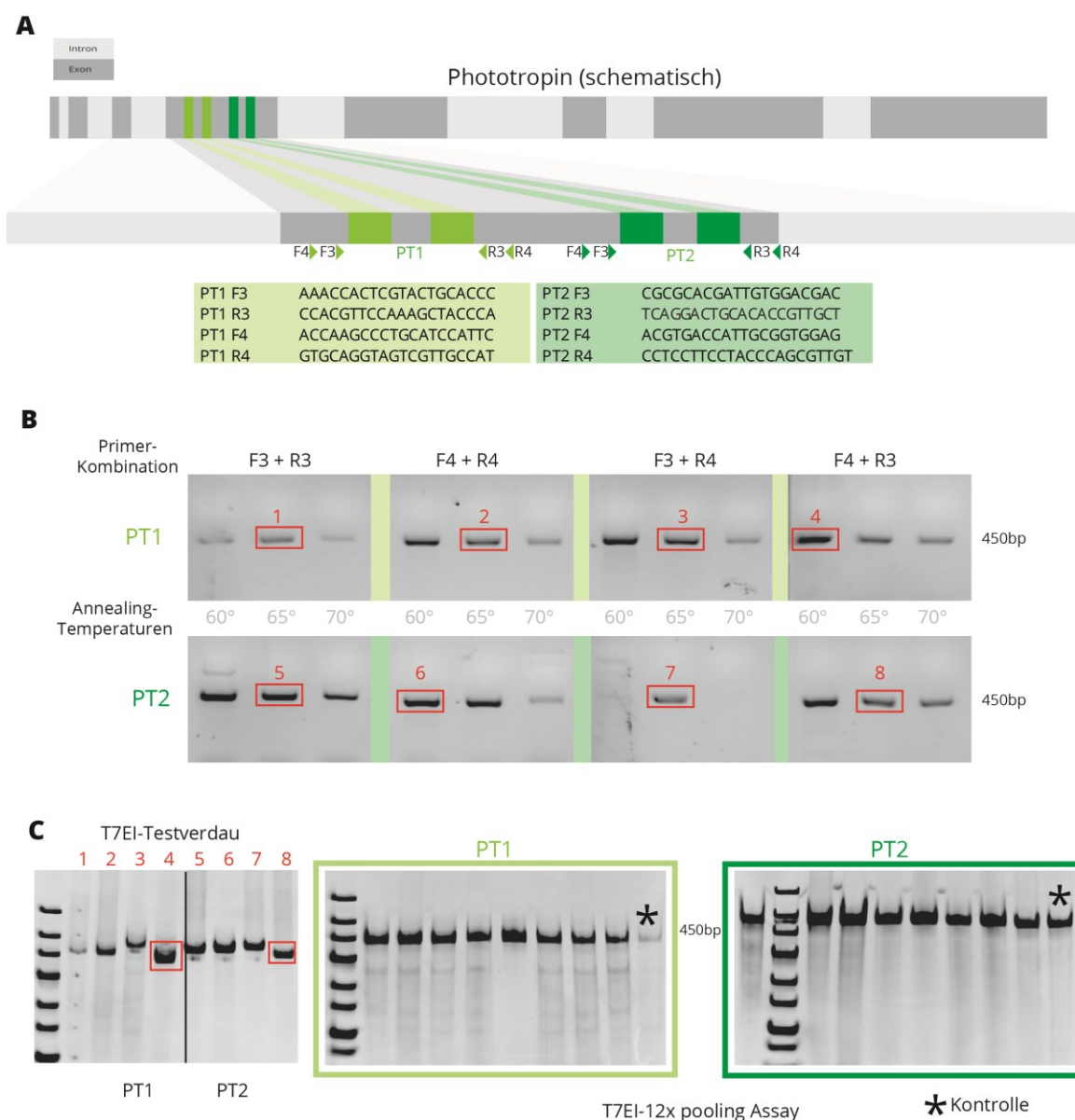
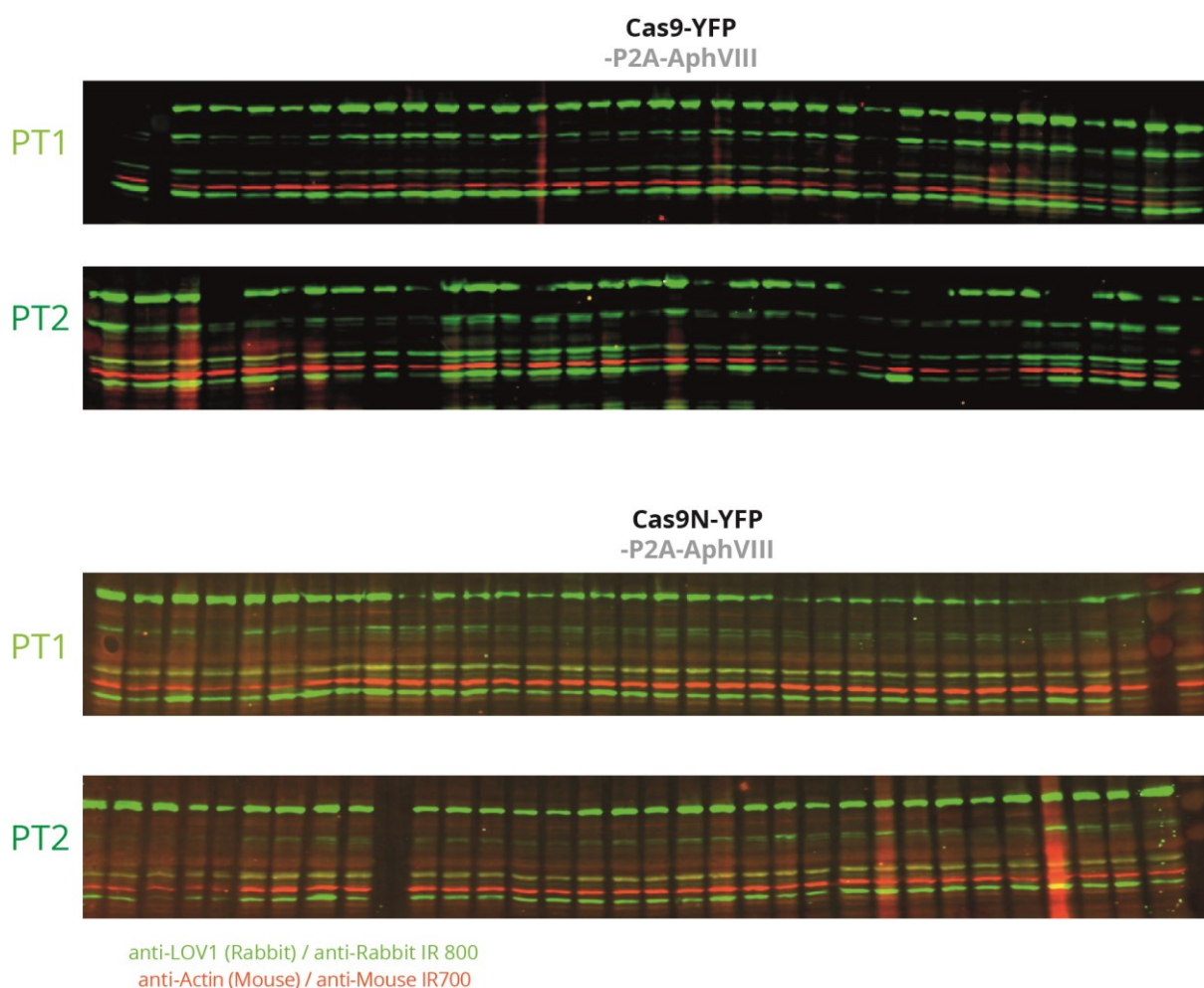


Abbildung 32 T7EI Assay Phototropin

(A) Schematische Darstellung der gewählten Phototropin-Zielsequenz. Aufgrund der sehr kurzen Exons 1-3 des Phototropins, war es nicht möglich, diese zu verwenden. Daher sind die gRNA-Protospacer gegen Sequenzen des Exons 4 gerichtet (hellgrüne und dunkelgrüne Rechtecke). Für die T7EI-Analysen und die späteren NGS-Experimente sind optimale PCR-Produkte eine Grundvoraussetzung. Für die Optimierung wurde eine Kombination von zwei vorwärts gerichteten Primern und zwei rückwärts komplementären Primern getestet. Als Template für die PCR-Reaktionen diente genomische DNA aus *Chlamydomonas*. (B) Für jede Kombination sind drei verschiedene Hybridisierungstemperaturen (engl. Annealing) analysiert worden (60°C, 65°C und 70°C). Die Länge der flankierenden Sequenzen von PT1 und PT2 betrug etwa 200 bp im PCR-Produkt. Dies diente dazu, eine spätere Analyse mittels NGS zu ermöglichen. Bei einer Read-Länge von 300 bp entsteht somit eine 100 bp Überlappung der vorwärts und rückwärts durchgeführten Sequenzierung eines PCR-Amplifikates. Dies minimiert falsch positive Ergebnisse, da nur Sequenzänderungen, die in beiden Richtungen detektiert wurden, berücksichtigt werden. Für jede Primer-Kombination konnte durch Variation der Annealing-Temperaturen ein PCR-Produkt gefunden werden, welches ohne unspezifische Nebenprodukte amplifiziert werden konnte (Nr1-8, rot umrandet) (C) Die PCR-Produkte aus (A) dienten als Substrate für einen Testverdau durch die T7EI-Endonuklease. Die Kombination 4 (PT1) und 8 (PT2) generierten dabei nur wenige unspezifische T7EI-Abbauprodukte und konnten daher für die Detektion möglicher Mutationen verwendet werden. Daneben: Für die Analyse möglicher Mutationen in den Zielsequenzen PT1 und PT2 fand ein 12-fach Pooling der experimentell generierten Klone statt. 100 µl aus Kulturen von zwölf Klonen wurden gemischt und die genomische DNA daraus isoliert. Diese diente als Template für die PCR-Reaktion. Durch Erhitzen und Re-hybridisieren der Fragmente sollten mögliche Mismatches entstehen, welche im T7EI-Assay detektiert werden. DNA-PAGE-Analysen zeigten auch in den Negativkontrollen (Asterisk) unspezifische Abbauprodukte.

Um eine optimale Amplifikation des gewünschten DNA-Abschnitts mittels PCR auf genomischer Template-DNA zu erreichen, müssen Primer gefunden werden, welche nur einmal innerhalb des Genoms binden. Dazu wurde das NCBI Primer BLAST Programm (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) verwendet. Nach Eingabe des gewünschten Amplifikationsproduktes sucht das Programm nach Oligonukleotid-Bindestellen, die nur innerhalb der gewünschten Sequenz binden. Für PT1 und PT2 konnten so jeweils zwei vorwärts (F3 + F4) und zwei rückwärts komplementäre Primersequenzen (R3 + R4) gefunden und getestet werden (Abbildung 32 A). Für die Optimierung fand man mit Annealing-Temperaturen von 60°C, 65°C und 70°C eine Gradient-PCR statt. Für PT1 und PT2 wurden die Bedingungen mit dem besten Verhältnis von PCR-Produktmenge und Spezifität gewählt (Abbildung 32 B, 1-8). Um auszuschließen, dass in WT-Fragmenten nach Denaturierung und Rehybridisierung Fehlpaarungen entstehen, was eine mögliche Folge von repetitiven Sequenzen sein kann, wurde zunächst ein Testverdau mit der T7EI-Mismatch-Endonuklease durchgeführt. Dabei erwiesen sich für PT1 Amplifikat 4 und für PT2 Amplifikat 8 als am besten geeignet, da sie nur wenig oder kein „Selbstverdau“ zeigten (Abbildung 32 C, links). Für die Analyse wurde Stamm CW15-302 mit den Konstrukten pAG-PT1 (C1::gPT1-1/C2::gPT1-2) und pAG-PT2 (C1::gPT2-1/C2::gPT2-2) sowie mit dem Cas9 Konstrukt HR::N<sub>C</sub>Y2A cotransformiert. Jeweils 96 der auf Paromomycin selektierten Klone wurden in 96er Mikrotiterplatten in TAP angeimpft und für ca. 4-6 Tage kultiviert. Um eine größere Anzahl an Klonen testen zu können, wurde ein 12-fach Pooling durchgeführt. Dies geschah durch die jeweilige Vereinigung der Kulturen der Klone A1-A12, B1-B12.....H1-H12 und anschließende Isolierung der genomischen DNA, welche als Template für die Amplifikation von PT1 (Primer F4 + R3) und PT2 (F4 + R3) herangezogen wurde. Hinderlich war, dass der Verdau von PT1 mit der T7EI-Endonuklease trotz Optimierung einen hohen Hintergrund zeigte, wodurch keine eindeutige Aussage über mögliche Mutationen getroffen werden kann. Erfreulicherweise zeigte PT2 ein deutliches Ergebnis und es wurden keine Banden in der Kontrolle nach dem Verdau gesehen (Abbildung 32 C, rechts; \* Asterisk = Kontrolle). Die Spuren 1-3 zeigten mehrere Abbauprodukte, welche in der Kontrolle trotz gleicher DNA-Menge nicht vorkamen. Diese Spuren entsprachen den Klonen A1-A12, B1-B12 und C1-C12. Aus diesen Klonen wurde nun erneut einzeln genomische DNA aufgereinigt und die Zielsequenz amplifiziert. Das PCR-Produkt dieser 36 Klone wurde mittels Sanger-Sequenzierung analysiert, jedoch konnte in keinem eine Mutation innerhalb des Zielabschnittes detektiert werden.



**Abbildung 33 Western-Blot-Analysen PT1 und PT2 Versuche**

Western-Blot-Analyse (Falschfarben-Darstellung): Kolonien des Stammes CW15-302 nach Transformation mit pNCYN2A oder der Nickase-Version von Cas9 und gPT1 oder gPT2. Detektion von PHOT (grünes Signal) mit Anti-LOV1-Antiserum (Rabbit; 1:2000) verwendet. Anti-Actin (Mouse; 1:5000) als Ladekontrolle (rotes Signal). Sekundäre Antikörper: IR-700-Anti-Mouse; IR-800-Anti-Rabbit beide 1:3000. Signaldetektion: Li-cor Scanner (Firma Odyssey).

Parallel zu den bisher beschriebenen Versuchen der InDel-Detektion durch die T7EI-Endonuklease, wurden auch Klone anhand von Westernblotting analysiert. Zusätzlich zu den bereits oben erwähnten Konstrukten, kam die Nickase-Version der Cas9 (Cas9N) zur Anwendung.

Es wurden in Kombination mit PT1 oder PT2 für beide der Cas9-Versionen 74 Klone analysiert. Wie in Abbildung 33 exemplarisch dargestellt, wurden auch hierbei keine Deletionen des Phototropins entdeckt. Die Verwendung eines Anti-Aktin-Antikörpers (rotes Signal) diente hierbei als interne Ladekontrolle und bewirkte eine wesentliche Erleichterung der Auswertung. Zudem konnten die bekannten Abbauprodukte des PHOT-Proteins als zusätzliche Kontrolle für schlecht geblottete Spuren verwendet werden, da in einer Knockout-Mutante auch diese nicht mehr vorhanden wären.

#### 3.3.2.4 High-Throughput-Sequenzierungen

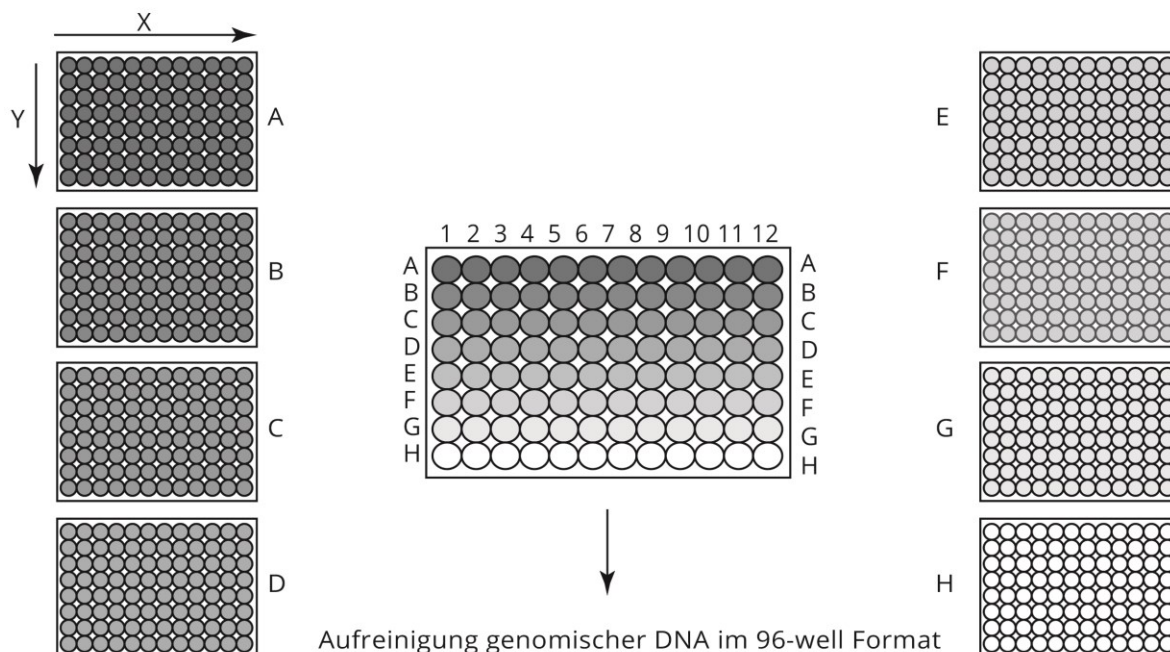
Um der Identifikation einer Phototropin Deletion näher zu kommen, wurde im folgenden Experiment getestet, ob die Analyse einer höheren Anzahl von Klonen zum gewünschten Ergebnis führt. Dazu wurde die Methode des sogenannten „Multiplexed Barcode Sequencings“ verwendet. Der Ansatz beruht auf der parallelen Sequenzierung einer Vielzahl von Zielsequenzen mittels Illumina-HiSeq (Liu et al., 2012). Für die Durchführung der Experimente fanden die in 3.3.2.3 für PT1 und PT2 optimierten Primerpaare Anwendung. Die Anfügung eines sogenannten „Barcodes“ am 5´ Ende der Primer, erlaubte eine spätere Zuordnung der Sequenzen. Ein Barcode besteht aus einer 8 bp langen Sequenz, welche für jeden Primer unterschiedlich ist. Dies ermöglicht es später, die erhaltenen Sequenzdaten unter Verwendung einer entsprechenden Software (CLC GENOMIC WORKBENCH) aufzuschlüsseln. Für PT1 und PT2 wurden die vorwärts komplementären Primer mit den Barcodes 1-24 versehen, sowie die rückwärts komplementären Primer mit den Barcodes 25-48. Um einen höheren Durchsatz an Klonen zu ermöglichen, erfolgte ein Pooling. Bei der Durchführung von acht verschiedenen Transformationsansätzen (Abbildung 34) wurden verschiedene Cas9-Expressionskonstrukte mit einer gRNA gegen PT1 oder PT2 verwendet und für jeden dieser acht Ansätze 96 Kolonien gepickt. Zur Isolation der genomischen DNA wurden die Mikrotiterplatten mit den Einzelklonen in Y-Richtung gepoolt, also acht Klone zu einem „pool“ zusammengefasst. Aus den gewonnenen 96 Pools wurde dann die genomische DNA isoliert (Machery Nagel; Plant II-Kit). Für die PCR wurde noch eine weitere Pooling-Ebene durch die Mischung der erhaltenen genomischen DNA der Reihen A+B, C+D, E+F sowie G+H verwendet. Die so generierten 48 Pools an genomischer DNA wurden anschließend für die PCR mit den 48 Barcode-Primern verwendet, dabei wurde jeder Barcode-Primer mit einem rückwärts komplementären ungelabelten Primer kombiniert. Die jeweils 48 PCR-Produkte für PT1 und für PT2 wurden im letzten Schritt zusammengefügt. Dank der hohen Anzahl an „reads“ (~2 Mio.) ist die Sequenzierung in einem einzigen Ansatz durchführbar. Die verwendete Pooling-Strategie erlaubte es, für die PT1 und PT2 Zielsequenzen jeweils 768 Kolonien zu überprüfen. Für jede Kolonie wurden dabei ~1000 – 1500 PCR-Produkte sequenziert, eine ausreichend hohe Anzahl, um mögliche Mutationen zu identifizieren.

Für die Analyse der erhaltenen Sequenzdaten wurde die „CLC GENOMICS WORKBENCH“-Software verwendet. Im ersten Schritt wurden anhand der 48 Barcodes die entsprechenden „reads“ sortiert. Da für PT1 und PT2 die gleichen 48 Barcodes verwendet wurden, musste in einem zweiten Schritt anhand der unterschiedlichen PT1- und PT2-Sequenzen eine weitere Trennung der Sequenzen durchgeführt werden. Oftmals wird für derartige Experimente eine SDS-PAGE



Reinigung der verwendeten Barcode-Primer empfohlen. Dies soll helfen, fehlerhafte Barcode-Primersequenzen zu entfernen, um ein besseres Sequenzierergebnis zu erhalten. Da die PAGE-Reinigung der Primer sehr teuer ist (~5000€) und nicht im Verhältnis zu den anfallenden Sequenzierkosten (750€) steht, wurde in den durchgeführten Experimenten darauf verzichtet. Wie sich herausstellte, war lediglich bei 10% der „reads“ keine Zuordnung zu einem Barcode möglich, ein akzeptables Ergebnis.

#### 8-fach Pooling in Y-Richtung



PT1	Stamm	Cas9-Konstrukt	gRNA
A	CC-1618	CY2A WT	PT1
B	CC-1618	CY2A WT	PT1
C	CC-1618	CY2A WT	PT1
D	CC-1618	CY2A D10A	PT1
E	CC-1618	CY2A D10A	PT1
F	CC-1618	CY2A D10A	PT1
G	CW15-302	PSAD	PT1
H	CW15-302	CY2A WT	PT1

Barcode 1-24	PT1 F4	ACCAAGCCCTGCATCCATTC
Barcode 25-48	PT1 R3	CCACGTTCCAAAGCTACCCA

PT2	Stamm	Cas9-Konstrukt	gRNA
A	CC-1618	CY2A WT	PT2
B	CC-1618	CY2A WT	PT2
C	CC-1618	CY2A D10A	PT2
D	CC-1618	CY2A D10A	PT2
E	CW15-302	PSAD	PT2
F	CW15-302	CY2A WT	PT2
G	CW15-302	CY2A WT	Mock (gCOP5)
H	CW15-302	CY2A D10A	Mock (gCOP5)

Barcode 1-24	PT2 F3	CGCGCACGATTGTGGACGAC
Barcode 25-48	PT2 R4	CCTCCTTCCTACCCAGCGTTGT

#### Abbildung 34 Multiplexed-Barcode-Sequencing

Für jeden der acht unterschiedlichen Transformationsansätze (A- H) wurden nach Selektion 96 Kolonien gepickt. Für die Isolation genomischer DNA wurden 8-fach Poolings der Mikrotiterplatten in Y-Richtung durchgeführt. Tabellarische Darstellung der verwendeten Barcodes und PT1- sowie PT2-Primersequenzen.

Für die weitere Analyse wurden die geordneten Sequenzen mit der WT-Sequenz abgeglichen (Alignment) und auf InDel-Mutationen überprüft. Dabei benutzt die Software einen Algorithmus, um die Signifikanz der Ergebnisse zu überprüfen. In keiner der Zielsequenzen PT1 oder PT2 konnten InDel-Mutationen gefunden werden. Für eine Analyse möglicher Punktmutationen konnte ebenfalls ein Algorithmus der Software verwendet werden. Hierbei werden Kontrollsequenzen (Reihen G+H) analysiert und wiederum mit den erhaltenen PT1- und PT2-Pools abgeglichen. Auch hierbei konnten keine signifikanten Mutationen detektiert werden. Die Schwierigkeit bestand darin, dass trotz optimierter PCR-Bedingungen auch in den Kontrollsequenzen eine Vielzahl an Fehlern innerhalb der Sequenzen detektiert wurde. Eine mögliche Ursache könnte der hohe GC-Gehalt des *C. reinhardtii*-Genoms sein.

#### 3.3.2.5 Cas9 im Modellsystem

Trotz der Vorversuche zur Expression von Cas9 im Nukleus und der Transkription der gRNA durch U6-Promotoren, konnten keine Mutationen durch direkte Selektion induziert werden. Infolgedessen sollte zunächst eine weitere Optimierung des CRISPR-Cas9-Systems für die Anwendung in *Chlamydomonas* unter Verwendung des bereits für die ZFN-Optimierung verwendeten Modellstamms ZF37 erfolgen. Es wurden gRNAs gegen die *COP3*- und *Zif268*-Zielsequenz (Abbildung 35 A) hergestellt, die entweder durch den U6-Promotor aus Weizen, den U6-Promotor aus *Chlamydomonas* oder mittels *in vitro* transkribiert wurden (siehe 3.3.1.2).

Während der Arbeiten zu Cas9 wurde eine neue Methode zur gezielten Genstilllegung in *A. thaliana* veröffentlicht (Baltes et al., 2014). Das Prinzip beruht auf einer transienten Expression von Nukleasen mittels *in vivo* Replikation einer Plasmid-DNA. Das aus dem Gemini-Virus stammende Plasmid ist in *A. thaliana* in der Lage, sich selbst zu replizieren. Für die Applikation in Gen-Deletionsexperimenten können Donor-DNA und Nuklease-Sequenzen auf dem Plasmid platziert werden, welche dann *in vivo* vervielfältigt werden. Das Vorhandensein mehrerer Kopien der Donor-DNA erhöht die Möglichkeit der homologen Rekombination mit der Zielsequenz. Zwar werden für die Replikation der Gemini-Virus Plasmid-DNA (pLSLR) auch Proteine der Wirtszelle benötigt, diese sind jedoch meist konservierter Art.

Für die Transkription der Nukleasen bleiben auch auf dem Gemini-Virus-Plasmid die *Chlamydomonas* Promotor- und Terminator-Sequenzen erhalten. Daher sollten sich auch bei einer nicht stattfindenden Replikation des Plasmids keine nennenswerten Nachteile ergeben. In einem ersten Versuch wurden *Zif268* und die Donor-DNA  $\Delta 120aphVIII$  in pLSLR kloniert (pLSLR *Zif268*/ $\Delta 120aphVIII$ ). Dieselben Sequenzen wurden zum Vergleich in einen Standardvektor (pjet 2.1)

kloniert. Transformationen von ZF37 mit diesen Plasmiden ergaben eine geringfügige Verbesserung (25%) der Transformationseffizienz mit pLSLR (Abbildung 35 B). Daher sollte als nächstes auch HR::Cas9 in pLSLR kloniert und mit p105 HR::Cas9 verglichen werden. p105 Cas9 und die Kontrolle ohne Nuklease generierten die gleiche Anzahl Pm-resistenter Kolonien. pLSLR Cas9 generierte etwa das Vierfache an Kolonien. Sechs der erhaltenen Klone wurden hinsichtlich der Reparatur des *aphVIII* analysiert. Alle sequenzierten Fragmente enthielten ein korrektes *aphVIII*-Markerger. Der hier gewählte Ansatz ist somit das erste positive Ergebnis der Anwendung von Cas9 in *C. reinhardtii*.

Als nächstes wurden ebenfalls die Cas9-Nickase und die Donor-DNA in Vektor pLSLR verwendet. Auch in dieser Versuchsreihe (Abbildung 35 C) erfolgte ein Vergleich mit dem Expressionsvektor p105. Die meisten Kolonien generierten die Negativkontrolle mit pLSLR. Lediglich p105 Cas9N generierte dieselbe Anzahl an Kolonien. In allen anderen Ansätzen mit Cas9 konnten keine Pm-resistenten Kolonien selektiert werden.

In den Ansätzen mit aktivem Cas9 konnten oftmals weniger Kolonien generiert werden als in den Kontrollen ohne Cas9. Daher bestand die Vermutung, dass eine hohe Expression von Cas9 durch den verwendeten HSP70A/RbcS2-Promotor zu einem toxischen Effekt in den Zellen führte.

Wie auch zuvor bei der erfolgreichen Anwendung der ZFNs, sollte nun eine transiente Expression durch den HSP70A-Promotor getestet werden. Zudem wurde ein pLSLR-Plasmid hergestellt, auf welchem sich die Donor-DNA, gZif268 und gCOP3 befanden. Für die transiente Expression durch den HS-Promotor sind drei verschiedene Konstrukte angefertigt worden. pHS-Cas9, pHS-In-Cas9, welches ein zusätzliches Intron vor der Cas9 Sequenz enthält und pHS-In-Cas9N (Abbildung 35 D). In dieser Versuchsreihe konnten lediglich mit der Positivkontrolle (pLSLR Zif268/ $\Delta$ 120*aphVIII*) Kolonien auf selektivem Agar isoliert werden.

In den bisherigen Experimenten wurde für die Reparatur des *aphVIII*-Markers stets eine doppelsträngige Plasmid-DNA verwendet. Experimente in verschiedenen anderen Modellsystemen haben hingegen gezeigt, dass auch synthetisch hergestellte einzelsträngige Oligonukleotide als Donor-DNA, sogenannte ssODNs (aus dem englischen: „*single-stranded-oligodesoxynucleotides*“; einzelsträngige Oligodesoxynukleotide), geeignet sind (Radecke et al., 2010; Bedell et al., 2012; Beumer et al., 2013). Für die Anwendung von Oligonukleotiden als Donor-DNA in *Chlamydomonas* wurden 100 bp lange Sequenzen verwendet. Diese wurde so gewählt, dass 50 bp upstream und downstream der Zielsequenz als Homologieregion dienten und die Zif268/COP3-Erkennungsstellen aus dem Marker entfernt werden sollten.

### 3. Ergebnisse

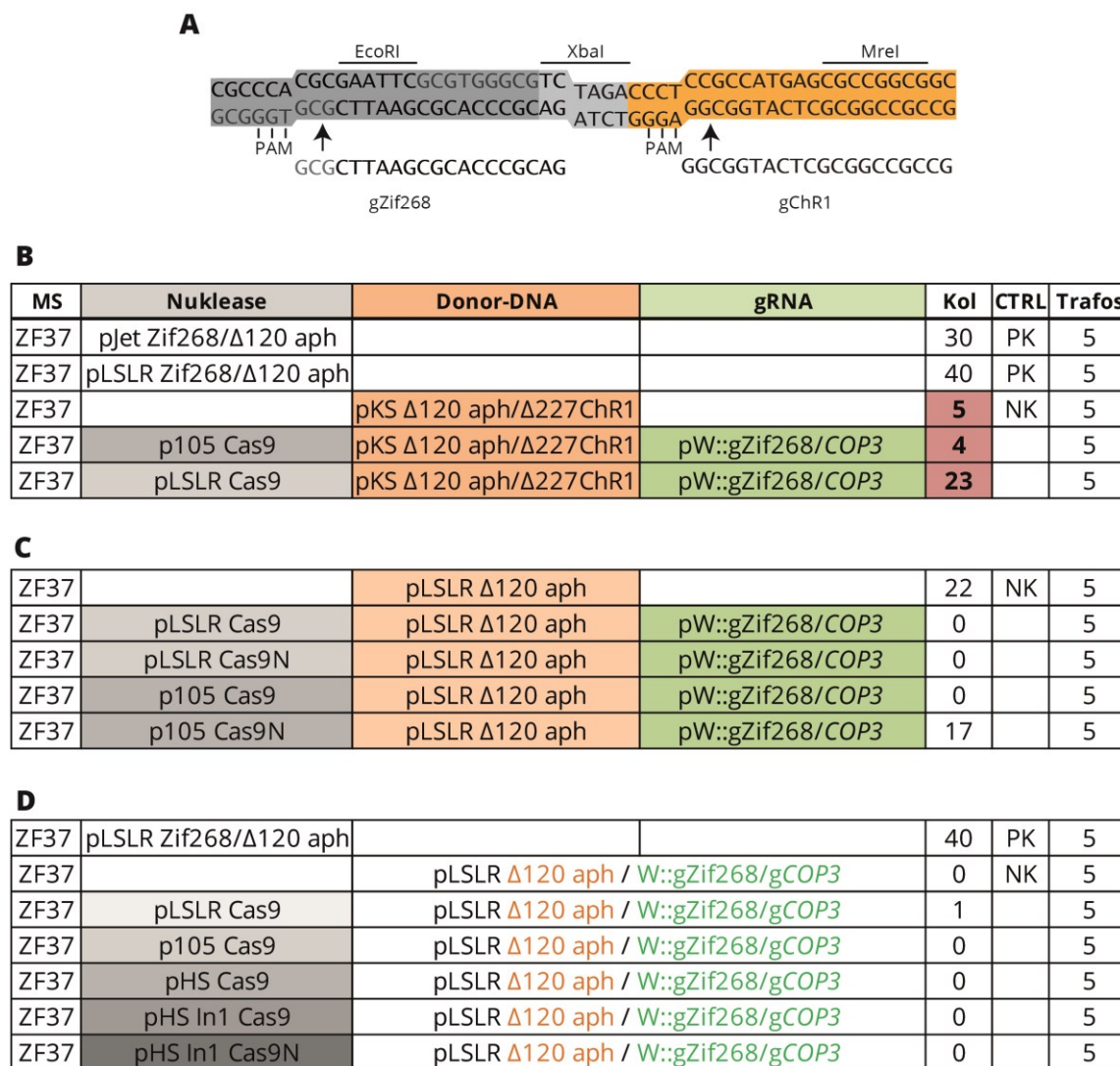


Abbildung 35 Cas9 pLSLR

(A) Schematische Darstellung der ZF37 gRNA Zielsequenzen. Zif268-Zielsequenz wurde grau, die *COP3*-Zielsequenz orange hinterlegt. Darunter: gRNA-Zielsequenzen (gZif268 und g*COP3*). Die Pfeile zeigen die Cas9-Schnittstellen. (B) Tabellarische Darstellung der durchgeführten Transformationen mit Modellstamm (MS) ZF37. „Kol“ - Anzahl generierter Pm-resistenter Kolonien. „CTRL“ - Kontrollen; „NK“ - Negativkontrolle; „PK“ - Positivkontrolle. (C) Tabellarische Darstellung vergleichender Experimente zu pLSLR und p105. (D) Ergebnisse der Versuche zur transienten Expression von Cas9 mit dem Hitzeschock induzierbaren Promotor-HSP70A.

In einem ersten Ansatz wurde ZF37 mit der bisherigen doppelsträngigen Donor-DNA und den einzelsträngigen Oligonukleotiden transformiert. Die hierfür verwendeten *COP3*-ZFNs generierten mit den Oligonukleotiden etwa halb so viele Kolonien im Vergleich zur doppelsträngigen DNA. Interessanterweise ergab die Kontrolle ohne ZFNs keine Kolonien. Da nur eine Konzentration an Oligonukleotiden getestet wurde, und diese nur schwer mit der verwendeten dsDNA zu vergleichen ist, stellt dieses Ergebnis ein vielversprechendes erstes Resultat dar (Abbildung 36). Für die Anwendung des CRISPR/Cas9-Systems hätten synthetisch hergestellte ssODNs als Donor-DNA den Vorteil, dass die Herstellung einer für das Zielgen spezifischen Matritze entfallen würde.

Dadurch wäre es möglich, eine Vielzahl an verschiedenen gRNAs/Zielgenen zu testen, ohne aufwendige Klonierungsarbeiten durchführen zu müssen.

Die bisherigen Versuche, das CRISPR-Cas9-System zu etablieren, lieferten bislang nur wenige positive Ergebnisse. Eine mögliche Ursache könnten dabei cytotoxische Effekte spielen. Expressionslevel sowie Dauer der Expression könnten sehr kritische Punkte in der Anwendung von Cas9 in *C. reinhardtii* sein. Außerdem ist die gRNA eine Variable, deren Einschätzung nur sehr schwer möglich ist und die von der RNAP-III hergestellten Transkripte könnten aufgrund eines nicht exakt definierbaren Transkriptionsstops in der Länge variieren.

Um eine transiente Expression von Cas9 und eine definierte Länge der gRNA zu ermöglichen, wurde in einer Versuchreihe getestet, ob die Transformation von *in vitro* hergestellter RNA eine mögliche Verbesserung darstellt. Mittels PCR wurde an die Cas9-Sequenz ein T7-Promotor angefügt, gefolgt von einer Kozak-Sequenz und Cas9. Um ein 5' Cap zu erhalten, wurde das mMESSAGE mMACHINE- Kit (Ambion) verwendet, für die Transkription der gRNA hingegen das Maxiscript-T7-Kit (Ambion), welches ein Transkript ohne 5' Cap synthetisiert.

Die bisherige Kombination von pKS  $\Delta 120aphVIII$  / Flag700 und pLSLR Cas9 war bis dahin der einzige Ansatz, welcher eine erfolgreiche Anwendung des CRISPR-Systems andeutete (Abbildung 35 A). Für die ersten Versuche einer Transformation mit RNA stand nur eine begrenzte Menge an synthetisierten Transkripten zur Verfügung. Deshalb wurde in einem ersten Experiment eine Kombination aus DNA und RNA verwendet. Dies diente dazu, eine mögliche erfolgreiche Kombination zu testen. Außerdem kamen auch die einzelsträngigen 100-bp *aphVIII* Oligos zur Anwendung (Abbildung 36 B). Tatsächlich gelang es auf diese Weise, etwa viermal mehr Kolonien (200 Kolonien) zu erzeugen als in der Negativkontrolle (50 Kolonien). In einem weiteren Ansatz wurde eine Mischung der bisher für die Expression von Cas9 hergestellten DNA-Expressionskonstrukten verwendet. Dies resultierte jedoch in derselben Anzahl an Kolonien wie die Negativkontrolle.

Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse mit der Kombination aus DNA und RNA, sollte nun festgestellt werden, welche der verwendeten Komponenten im Zusammenspiel ein funktionales CRISPR-System ergeben könnten. Die Auswertung dieser Experimente wird nachgelagert erfolgen, da sie nicht mehr direkter Bestandteil dieser Arbeit ist.

**A**

MS	Nuklease	Donor-DNA	CTRL	Kol	Trafos
ZF37	Zif268	dsΔ120aphVIII		100	5
ZF37	COP3	dsΔ120aphVIII	PK	100	5
ZF37	COP3	ssODN 100aphVIII		40	5
ZF37		ssODN 100aphVIII	NK	0	5

**B**

Ansatz 1	Ansatz 2	CTRL
RNA gZif268	pW::gZif268/gCOP3	
RNA gCOP3	pHS Int1 Cas9N	
	p105 Cas9	
	pHS Cas9	
RNA Cas9	pHS Int1 Cas9	
DNA pLSLR Cas9	pLSLR Cas9	
ssODN 100aphVIII	ssODN 100aphVIII	ssODN 100aphVIII
dsΔ120aphVIII	dsΔ120aphVIII	dsΔ120aphVIII
<b>200</b>	<b>40</b>	<b>50</b>
<b>Kolonien</b>		

**Abbildung 36 Cas9 RNA Transformationen**

(A) Allgemein: Donor-DNA orange hinterlegt, gRNA grün und Nukleasen grau. Transformationen des Modellstammes ZF37 um eine mögliche Anwendung von Einzelstrang-DNA als Reparatur-Matrize zu testen. 100 bp lange Oligonukleotide welche 50 bp 5' und 3' der ZFN-Zielssequenz umgaben, dienten als Donor-DNA. Es gelang in den Positivkontrollen mit Zif268 und COP3-ZFNs und dem Standard dsDNA-Template (Δ120aphVIII) circa 100 Kolonien aus 5 Transformationen zu generieren. Mit der Einzelstrang -DNA (ssODN 100<sub>C</sub>aphVIII) entstand etwa die Hälfte an Kolonien. In der Negativkontrolle mit Oligo, ohne ZFNs, fand keine Reparatur des CraphVIII statt. (B) Ansatz1: In diesem Versuchsansatz kam eine Mischung aus DNA und RNA zur Anwendung. Um mögliche funktionale Kombination möglichst schnell herauszufinden, wurde in vitro hergestellte RNA für gZif268, gCOP3 und Cas9 mit der Plasmid-DNA für pLSLR Cas9 und einzelsträngiger (ssODN 100<sub>C</sub>aphVIII) als auch doppelsträngiger (dsΔ120aphVIII) Donor-DNA gemischt. Ansatz 2: Für die Transkription der gRNA wurde pW::gZif268/gCOP3 verwendet. Die Expression von Cas9 erfolgte mit den zuvor beschriebenen HS-Promotor Konstrukten, plus pLSLR Cas9. Donor-DNA wie in Ansatz 1. Auswertung bei 5 Transformationen je Ansatz. Ansatz 1: 200 Kolonien; Ansatz 2: 40 Kolonien; Kontrolle: 50 Kolonien.

**3.4 Genom Sequenzierung des Stammes CW15-302**

Stamm CW15-302 ist bisher der einzige Stamm, in welchem durch gezielte Genstilllegung die Deletion eines nicht selektierbaren Gens in *C. reinhardtii* gelungen ist (Zorin et al., 2009) (siehe Kapitel 3.1.4). Zwei wichtige Merkmale dieses Stammes sind die gute Transformationseffizienz und das schnelle Wachstum. Leider ist er aufgrund der fehlenden Flagellen für physiologische Untersuchungen nicht geeignet. Auch das Kreuzen in einen anderen Stamm ist daher nicht möglich. Im Rahmen eines Sequenzierungsprojektes verschiedener *Chlamydomonas* Laborstämme (Labor von Prof. Sabeeha Merchant; UCLA) wurde die Entstehung sogenannter

„Single Nucleotide Polymorphisms – SNPs“ untersucht. Darüber hinaus sollten auch die Verwandtschaftsverhältnisse der standardmäßig im Labor verwendeten Stämme geklärt werden. Als Teil dieses Projektes wurde auch das Genom des hier im Labor gehaltenen Stammes CW15-302 sequenziert. In Zusammenarbeit mit Dr. Sean Gallaher aus dem Merchant Labor erfolgte eine Analyse der Sequenzdaten von CW15-302 auf sogenannte „High Impact Mutations“. Zu dieser Art von Mutationen zählen Insertionen, Deletionen oder Basenpaaränderungen, welche zu einem frühzeitigen Stopcodon führen. Als Referenz wurde die aktuelle Version des *Chlamydomonas* Genomprojektes V5.3 (Phytozome V9) verwendet. Ein Ziel dieser Analysen ist die Detektion möglicher defekter Flagellengene. Auf diese Weise könnte Stamm CW15-302 mit einem funktionalen Gen komplementiert werden, um so die Motilität wiederherzustellen. Alternativ könnten auch Gendefekte in bekannten Komponenten der DNA-Reperaturmaschinerie zu neuen Erkenntnissen führen, welche diesen Stamm für Deletionsexperimente prädestiniert.

Um die Ergebnisse übersichtlich zu gestalten, ist in Tabelle 4 für jeden Locus nur eine Mutation angegeben. Oftmals zeigte die Analyse eine Anhäufung von Mutationen innerhalb einer Gensequenz. Insgesamt konnten 99 Mutationen in Stamm CW15-302 detektiert werden. Von diesen 99 sind bisher nur neun annotiert. Für die Auswertung der dadurch erhaltenen Gen-Identifikationsnummern wurde das „Algal Functional Annotation Tool“ verwendet ([http://pathways.mcdb.ucla.edu/algal/id\\_conversion.html](http://pathways.mcdb.ucla.edu/algal/id_conversion.html)). Unter den bekannten Genen befanden sich zwei Cyclasen CYA1 und CYG22. Das FAP196 (Flagella associated protein 196), welches bereits als Bestandteil des Flagellen-Proteoms identifiziert werden konnte, ist noch nicht funktional charakterisiert worden. Für CGL133, OPR51 und TUL1 (Tubulin-Like Protein) stehen ebenfalls keine weiteren funktionalen Informationen zur Verfügung. Die Annotation von NAR1.5 klassifiziert dieses Protein als membranständigen Formate/Nitrit-Transporter. Zwei der identifizierten Mutationen sind in anderen Organismen charakterisiert worden. MUS81 ist eine bekannte Endonuklease, welche an der Auflösung von Holliday-Strukturen während der homologen Rekombination beteiligt ist (siehe Kapitel 1.2.2.1), weshalb ihr ein hoher Stellenwert für die hier behandelte Thematik beigemessen wird. Das letzte funktional annotierte Gen, welches in CW15-302 mutierte, ist CAF1-A, die große Untereinheit des CAF-1 Komplexes (siehe Kapitel 1.2.1). CAF-1 ist an der Bildung des Heterochromatins beteiligt, eine Dysfunktion führt in *A. thaliana* zu einer erhöhten Expression an der homologen Rekombination beteiligten Genen. Daher ist auch diese Mutation ein wichtiger Hinweis auf die in CW15-302 verbesserte Effizienz der homologen Rekombination.



Tabelle 4 Liste Mutationen Stamm CW15-302

	C	GENE-ID	Mutation					
1	1	Cre01.g053450	-1426?	CYA1	50	12	g13210	-568,
2	2	Cre02.g100500	-1528	CYG22	51	12	Cre12.g557850	-523,
3	4	g4890	-401		52	12	g13382	-687,
4	5	g5261	-723		53	12	Cre12.g555600	Q236*,
5	8	g8507	-13		54	12	g13432	-714,
6	11	g11641	- 1072		55	12	Cre12.g554929	C652*,
7	11	g11650	C3260*		56	12	Cre12.g553850	-146?,
8	11	g11757	-2217?		57	12	Cre12.g552001	-180NSN?,
9	11	Cre11.g469500	-1327A?		58	12	Cre12.g551700	-2624,
10	12	Cre12.g554950	-3191*		59	12	g13510	-595,
11	12	g13546	Q851*	FAP196	60	12	Cre12.g551446	-98,
12	12	Cre12.g540050	-562		61	12	g13518	-23?,
13	12	g13822	-1179GLV?		62	12	g13537	-27?,
14	15	g15268	-4659		63	12	g13546	Q1420*,
15	15	g15277	-367		64	12	Cre12.g547250	-476?,
16	15	g15416	-845G?		65	12	Cre12.g547200	-205,
17	15	Cre15.g639350	S515S*GP		66	12	Cre12.g543700	Q821*,
18	15	Cre15.g641100	S1008*		67	12	Cre12.g542550	-573?,
19	15	g15457	L5058L*		68	12	Cre12.g541750	Y29*,
20	16	Cre16.g651850	-1597		69	12	Cre12.g541250	M1V,
21	17	Cre17.g728250	-3053P?		70	12	Cre12.g539650	-4697,
22	17	Cre17.g729700	-1019	CGL133	71	12	g13802	-416A?,
23	17	g17813	-1211		72	12	g13823	-231,
24	17	Cre17.g739551	-2374		73	15	g15416	-1847G?,
25	17	Cre17.g740000	-1336?		74	15	Cre15.g639200	-61?,
26	1	g199	-179,		75	15	Cre15.g639050	-670,
27	2	g2839	-443,		76	15	g15457	Q6043*,
28	3	Cre03.g178900	-503,		77	15	g15469	-156,
29	4	g4404	-497,		78	15	g15699	-131,
30	4	g4514	-163		79	16	Cre16.g652700	M1V,
31	4	Cre04.g212400	*887Q,		80	16	Cre16.g652700	-856,
32	5	g5868	-158,		81	16	Cre16.g653100	-348,
33	9	Cre09.g388700	-1225,		82	16	Cre16.g653900	-496?,
34	10	g10022	-3490?,		83	16	Cre16.g654950	-2621,
35	11	g11481	-228,		84	17	Cre17.g727900	-1498A?,
36	11	g11641	-1587,		85	17	Cre17.g728450	Y3652*,
37	11	g11667	*2596K,		86	17	g17608	Q233*,
38	11	g11667	-374,		87	17	Cre17.g728650	T618T*GA,
39	11	g11671	-1871,		88	17	g17653	-1235YH?,
40	11	g11692	-570G?,		89	17	Cre17.g730650	-473,
41	11	g11712	-1090G?,		90	17	Cre17.g731450	S298*,
42	11	g11716	-685,		91	17	g17715	-14,
43	11	g11732	-63P?,		92	17	g17720	Q129*,
44	11	Cre11.g467800	A367E*P,		93	17	g17790	-450,
45	11	Cre11.g468000	-437I?,		94	17	Cre17.g736300	-1589,
46	11	Cre11.g468150	K105*,		95	17	g17817	-1276,
47	11	g11757	-2658?,		96	17	Cre17.g739050	-810?,
48	12	Cre12.g495050	L844*,	OPR51	97	17	Cre17.g739551	-1030,
49	12	Cre12.g500900	-345,		98	17	g17911	Q259*,
					99	17	g18037	-3750,



Interessanterweise zeigt sich eine klare Anhäufung der detektierten Mutationen auf den Chromosomen 11, 12, 15 und 17. Die Ursache hierfür ist unbekannt, wird jedoch momentan im Labor von Prof. Sabeeha Merchant anhand der generierten Sequenzierungsdatensätze analysiert. Die weitere Analyse ergab, dass in etwa der Hälfte der mutierten Loci mehr als eine Mutation vorlag.

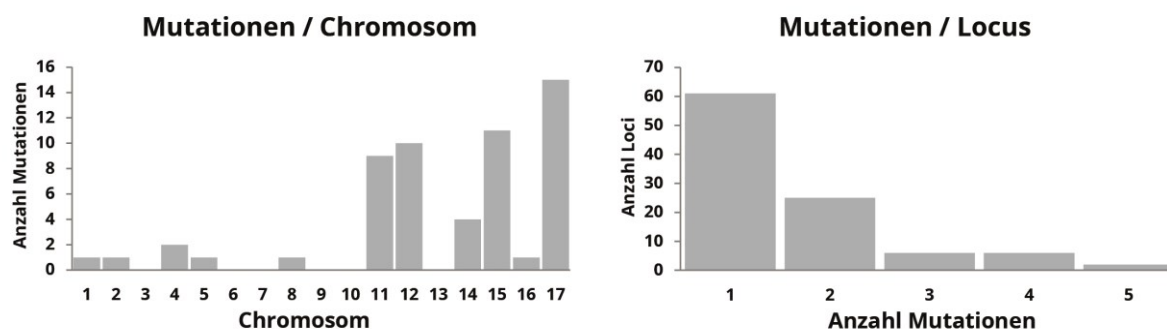


Abbildung 37 Auswertung Mutationen in Stamm CW15-302

Das Balkendiagramm links beschreibt die Aufteilung der in CW15-302 detektierten Anzahl an Mutationen und deren Verteilung auf die 17 Chromosomen von *C. reinhardtii*. Es tritt keine statistische Verteilung auf, sondern eine Ungleichverteilung der Mutationen auf die Chromosomen 11, 12, 14, 15 und 17. Das Balkendiagramm rechts zeigt die Anzahl an detektierten Mutationen je Gen-Locus. In etwa 50% der Fälle treten zwei oder mehr Mutationen auf.

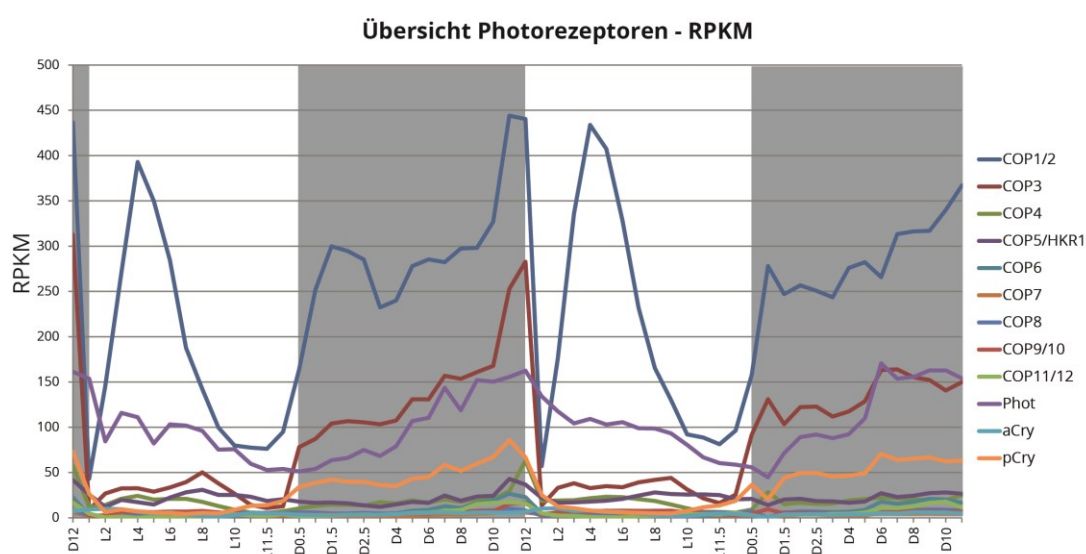
## 3.5 Diurnale Photorezeptor-mRNA Transkription

Die in diesem Kapitel behandelten Datensätze zu diurnalen Expression der Photorezeptor mRNA, wurden von der Arbeitsgruppe Merchant (UCLA) bereitgestellt. Im Rahmen eines Projektes sollten Änderungen der mRNA-Level während des Tag-Nacht-Zyklus analysiert werden. Dazu wurde eine *Chlamydomonas*-Kultur synchronisiert und über einen Zeitraum von 48h stündlich Proben genommen. Nach Extraktion konnte die Gesamt-RNA diese in cDNA übersetzt werden, um so eine Analyse durch Illumina-Sequenzierung zu ermöglichen. Diese als RNA-Seq bezeichnete Technik ist ein Hochdurchsatzverfahren zur Analyse des Transkriptoms einer Zelle oder einer Zellpopulation. Die Anzahl der erhaltenen Sequenzen (Reads) einer mRNA geben dabei Aufschluss über die vorliegende Transkriptmenge. Um einen Vergleich der erhaltenen Sequenzdaten zu ermöglichen, wird der Datensatz normalisiert. Dabei werden verschiedene Faktoren eines experimentellen Ansatzes berücksichtigt. Zum einen die Länge einer betrachteten mRNA und zum anderen die Anzahl der erfolgten Reads und die Gesamtzahl der im Experiment erhaltenen Reads. Diese als RPKM (reads per kilobase of exon model per million mapped reads) bezeichnete Methode der Normalisierung ermöglicht sowohl einen Datenvergleich innerhalb

eines Experimentes als auch den Vergleich von Experimenten unter verschiedenen Versuchsbedingungen (Mortazavi et al., 2008).

Es ist anzumerken, dass die Versuchsbedingungen im Experiment nicht exakt den physiologischen Bedingungen entsprechen. Der Übergang vom Tag- in den Nacht-Zustand und umgekehrt wurde durch An- bzw. Abschalten der Beleuchtung in einem Inkubator simuliert. Auch die verwendete gleichbleibende Lichtintensität entspricht nicht dem natürlichen Tageslauf.

In Abbildung 38 ist eine Übersicht der RPKM normalisierten RNA-Seq-Daten aller Photorezeptoren gegeben. Dies soll zunächst dazu einem Vergleich der Photorezeptoren untereinander dienen, bevor dann die einzelnen Kategorien verglichen werden. Gezeigt ist der komplette Datensatz, welcher zwei Tag-Nacht-Zyklen umfasst. Eine allgemeine Tendenz der Photorezeptor-Transkriptmenge ist die Akkumulation während der Dunkelphase. Mit Beginn der Lichtphase kommt es zu einem starken Abfall der Transkriptmenge, die Ausprägung ist dabei unterschiedlich. Das höchste Level an Transkripten zeigen *COP1/2*, *COP3* (Chr1) und Phototropin. Im Vergleich ist die Menge an Transkripten der Histidinkinase-Rhodopsine eher niedrig. *COP1/2* zeigt nicht nur das höchste Level an Transkripten ( $RPKM^{MAX} = 444$ ), sondern auch einen ungewöhnlichen Kurvenverlauf. Nach Applikation von Licht kommt es zu einem starken Abfall der Transkriptmenge. Dies wird jedoch innerhalb von 3 bis 4 Stunden im Licht umgekehrt, so dass das Transkriptlevel wieder den Ausgangswert vor Belichtung erreicht. Anschließend sinkt das Niveau wieder auf ungefähr 25% des Maximalwertes, um dann in der Dunkelphase wieder anzusteigen.



**Abbildung 38 Übersicht der RPKM normalisierten Transkriptlevel**

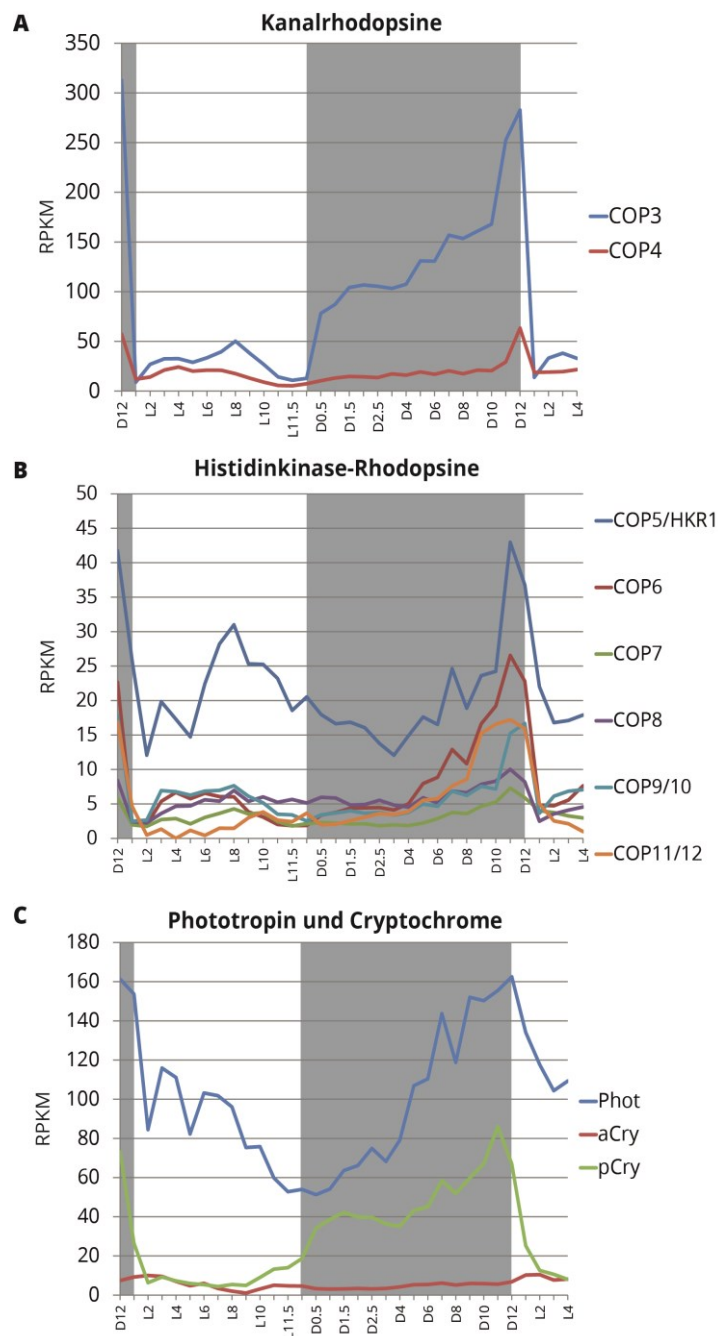
Übersicht der diurnalen Änderungen der mRNA-Transkriptmenge. RPKM (reads per kilobase of exon model per million mapped reads) normalisierte Werte. Die Dunkelphasen sind grau hinterlegt.

Die beiden Kanalrhodopsine 1+2 (*COP3* + *COP4*) zeigen eine unerwartet große Differenz der gemessenen Transkriptmenge. Wie bei allen anderen Photorezeptoren, wird auch hier das Maximum an Reads am Ende der DP erreicht. Jedoch zeigt *COP3* ein fünfmal höheres Transkriptlevel ( $\text{RPKM}^{\text{MAX}} = 312$ ) als *COP4* ( $\text{RPKM}^{\text{MAX}} = 63$ ). Auch die Kanalrhodopsine unterliegen einer starken Reduktion der Transkriptmenge mit Beginn der Lichtphase (Abbildung 39 A). Der Kurvenverlauf von *COP3* ist dabei sehr interessant, da mehrere lichtabhängige Prozesse zu beobachten sind. Innerhalb der ersten 30 Minuten der Dunkelfase (L12-D0.5) gibt es einen sprunghaften Anstieg der RPKM-Werte. Dies deutet auf eine lichtabhängige Derepression der Transkription von *COP3* hin. Diesem kurzen Anstieg folgt eine Phase des kontinuierlichen Anstiegs bis zum Erreichen von D10. Zwischen D10 und D12 erhöht sich der RPKM-Wert um fast das Doppelte, anschließend sinkt er innerhalb einer Stunde fast auf Nullniveau. Es können hier also zwei lichtabhängige Regulationsebenen erkannt werden, eine Ebene zu Beginn und Ende der Lichtphase sowie eine lichtunabhängige Ebene zwischen D10 und D12. Diese experimentellen Daten passen sehr gut zu den biochemischen Expressiondaten der ChR1-Proteinmenge (siehe Kapitel 3.6.2.5) im Phototropin-Deletionsstamm  $\Delta\text{PHOT}^{\text{G5}}$ . Dieser zeigte deutlich einen Verlust des Licht- und Phototropin-abhängigen Abbaus von ChR1. Es konnte jedoch auch eine Phototropin unabhängige Reduktion an ChR1 detektiert werden. Eine mögliche Erklärung ist die Regulation durch Komponenten der Circadian Uhr. In Versuchen zur Analyse von aCRY Interaktionspartnern wurden auch Peptide aus PHOT detektiert (Prager, 2012).

Die Daten der Histidinkinase-Rhodopsine zeigen eine wesentlich geringere Menge an Transkripten. Die  $\text{RPKM}^{\text{MAX}}$ -Werte liegen zwischen 7 und 42. *COP5* mit einem Wert von 42 weist zudem im Laufe der Lichtphase einen geringen Anstieg der Transkriptmenge auf, ähnlich dem Verlauf von *COP1/2* (Abbildung 39 B). Auch die Histidinkinase-Rhodopsine zeigen einen lichtunabhängigen Anstieg der Werte am Ende der Dunkelfase (D7 – D11). Interessant ist, dass bis auf *COP9/10*, alle Transkriptmengen der Histidinkinase-Rhodopsine ihr Maximum etwa 1 Stunde vor Beginn der Lichtphase (D11) erreichen, diese aber bis D12 wieder absinken. Daraus lässt sich schließen, dass die Regulation der Transkriptmengen nicht lichtabhängig verläuft, sondern könnte ebenfalls durch die circadian Uhr reguliert werden.

Der  $\text{RPKM}^{\text{MAX}}$  von Phototropin liegt bei 170 und ist somit der dritt höchste nach *COP1/2* und *COP3*. Als einziger Photorezeptor nimmt die Transkriptmenge von *PHOT* im Verlauf der Lichtphase eher kontinuierlich ab, es kommt auch nicht zu dem sonst charakteristischen Knick im Verlauf zu Beginn der Lichtphase. aCRY hat insgesamt ein sehr niedriges Expressionsniveau mit  $\text{RPKM}^{\text{MAX}} = 10$ , welches sich auch im Verlauf des Tag-Nacht-Zyklus nur geringfügig ändert. Im Gegensatz dazu weist pCRY einen deutlich höheren  $\text{RPKM}^{\text{MAX}}$  von 85 auf und zeigt den typischen Photorezeptor-Verlauf (Abbildung 39 C).

---



**Abbildung 39** Diurnale Änderung der Photorezeptor mRNA

(A) Auswertung der RPKM-Werte für COP3 und COP4. Die Dunkelphasen sind grau hinterlegt. Die Beschriftung der X-Achse entspricht „D“ für Dunkel oder „L“ für Licht, gefolgt von der Anzahl an Stunden in dieser Phase. Die Transkriptmenge von COP3 übersteigt die von COP4 um ein Vielfaches (~5x). Beide zeigen einen sprunghaften Anstieg der detektierten RPKM-Werte zwischen D10 und D12 vor Beginn der Lichtphase. Die Transkriptmenge sinkt beinahe auf Nullniveau mit Beginn der Lichtphase. Interessant ist auch der steile Anstieg der RPKM-Werte von COP3 innerhalb der ersten halben Stunde der Dunkelphase. (B) Auswertung der Histidinkinase-Rhodopsin RPKM-Werte. Ausgenommen COP9/10, zeigen alle Histidinkinase-Rhodopsine einen sprunghaften Anstieg der RPKM-Werte mit Beginn von D8. Das Maximum wird bei D11 erreicht und sinkt vor Beginn der Lichtphase wieder ab. COP9/10 verhält sich hingegen wie die Kanalrhodopsine und zeigt einen sprunghaften Anstieg bei D10, der sein Maximum bei D12 erreicht. Ebenfalls und nach Applikation von Licht wieder abfällt. (C) Phototropin und die beiden Cryptochrome zeigen einen anderen Verlauf als die Rhodopsine. Der RPKM von PHOT steigt von D0.5 bis D12 kontinuierlich an. Mit Beginn der Lichtphase knickt der Kurvenverlauf ab und die Werte sinken um etwa ein Drittel. Dies ist weniger als für die Rhodopsine beobachtet. Die Werte für pCry erreichen kurz nach Belichtung (LP2 – LP8) ihr Minimum. Daraufhin folgt ein stetiger Anstieg bis D11 und noch vor Beginn der Lichtphase fällt das Niveau wieder ab und erreicht bei LP2 wieder den Minimalwert. aCRY zeigt von allen analysierten Photorezeptoren die niedrigsten RPKM-Werte. Aufgrund der geringen Werte kann keine signifikante Änderung der Transkriptmenge im diurnalen Verlauf detektiert werden.

## 3.6 Charakterisierung von $\Delta PHOT^{G5}$

### 3.6.1 Phototropin reguliert die Expression von LHCSR3

Die im Folgenden vorgestellten Experimente wurden von Dr. Dimtris Petrousos durchgeführt. Grundlage seiner Experimente bildeten komplementierte Stämme, welche im Rahmen dieser Arbeit hergestellt worden sind. Die Komplementierungen erfolgten in dem von Boris Zorin hergestellten Phototropin-Deletionsstamm  $\Delta PHOT^{G5}$  (Zorin et al., 2009).

Photosynthetische Organismen konvertieren Lichtenergie zu organischen Verbindungen durch stetige Produktion von NADPH und ATP, welche dann im Benson-Calvin Zyklus für die CO<sub>2</sub>-Assimilation verwendet werden (Allen, 2002). Die Endprodukte des Calvin-Zyklus, organische Zuckerverbindungen, dienen nun zum einen als Substrate für die Atmungskette, um Energie zu produzieren, und zum anderen als Intermediate für organische Verbindungen, welche für das Zellwachstum benötigt werden.

Häufig übersteigt jedoch das absorbierte Licht die Kapazitäten des Photosynthese-Apparates der Zellen. Die Zelle hat einen Mechanismus entwickelt, um sich vor überschüssiger Lichtenergie zu schützen (Li et al., 2009). Einer der Hauptwege der Photoprotektion in Algen ist die thermische Dissipation der überschüssigen Lichtenergie, welche als qE bezeichnet wird und eine Komponente der Nicht-Photochemischen Löschung oder „Quenchings“ darstellt. qE benötigt das bei hohen Lichtintensitäten exprimierte Proteine LHCSR3, welches ein Bestandteil des Lichtsammelkomplexes in Algen ist (Peers et al., 2009), sowie einen elektrochemischen Protonengradienten an der Thylakoidmembran (Tolter et al., 2011). Hierbei wird die Expression von LHCSR3 durch Calcium und das Calcium-Bindeprotein CAS reguliert (Petrousos et al., 2011).

Aufgrund der lichtabhängigen Expression von LHCSR3 sollte in dieser Kollaboration festgestellt werden, ob eine Verbindung zwischen Lichtabsorption und Photoprotektion besteht.

Der erste Schritt zur Untersuchung einer möglichen chromatischen Regulation des NPQ und LHCSR3 bestand darin, das Aktionspektrum des NPQ zu bestimmen. Dazu wurden Messungen am „Okazaki Large Spectrograph (OLS)“ durchgeführt (Dr. Dimitris Petrousos). Das OLS ist der größte Spektrograph weltweit. Das Instrument wird mit einer 30kW Xenon-Bogenlampe betrieben und projiziert ein Wellenlängenspektrum von 250nm bis 1000nm auf einen 10m umfassenden Bogen. Dabei wird in der Fokusebene eine Lichtstärke von bis zu 2000  $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$  erreicht.

*Chlamydomonas* Kulturen des Wildtypstammes 137C und einer Photoprotektiven-Mutante (npq4) wurden mit dem OLS für 4 Stunden bei einer Lichtstärke von 250  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  belichtet. Dabei wurden die Wellenlängen des sichtbaren Lichtes untersucht (Dr. Dimitris Petroustos). Ziel des Experimentes war es, die Wellenlängenabhängigkeit der lichtinduzierten Expression des LHCSR3 Proteins zu testen, welches für die Induzierung des qE in Algen verantwortlich ist. Wie bereits erwähnt, wird dieses Protein in *Chlamydomonas* nur bei hohen Lichtintensitäten exprimiert.

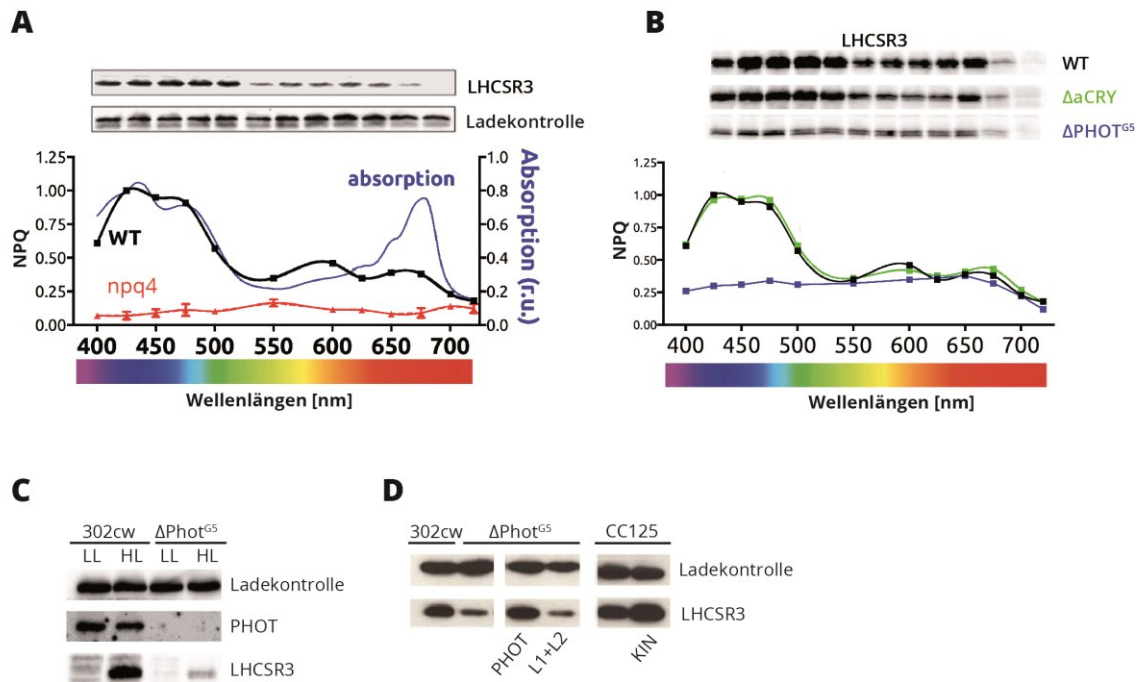


Abbildung 40 *Chlamydomonas* Phototropin reguliert die LHCSR3 Expression

(A) NPQ-Aktionspektrum eines Wildtypstammes (137C) und einer  $\Delta LHCSR3$ -Mutante (npq4). NPQ wurde berechnet aus  $(F_m - F_m')/F_m$ , wobei  $F_m$  die maximale Fluoreszenz-Emission der Probe im Dunkeln ist.  $F_m'$  ist der  $F_m$ -Wert nach Belichtung mit hoher Lichtintensität. Western-Blot-Analysen der LHCSR3-Akkumulation im Wildtyp. (B) NPQ-Aktionsspektrum und Wellenlängen abhängige LHCSR3-Expression des Wildtypstammes und der  $aCRY$ - und  $PHOT$ -Mutanten ( $\Delta PHOT^{G5}$  und  $\Delta aCRY$ ). (C) Lichtintensitätsabhängigkeit der LHCSR3 Expression in  $\Delta PHOT^{G5}$  und dem Parentalstamm CW15-302. Western-Blot-Analysen der Rohextrakte nach 4 Stunden Belichtung bei niedrigen (LL; 20  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) und hohen (HL; 250  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) Lichtintensitäten. (D) Kulturen der Wildtyp-, Deletions- und Komplementationsstämme wurden unter Schwachlicht (20  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) und dann für 4 Stunden unter hoher Lichtintensität (250  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) kultiviert. Verändert nach: Dr. Dimitris Petroustos; unveröffentlichte Resultate.

Wie in Abbildung 40 A zu sehen ist, ist die Induktion der LHCSR3 Expression nicht bei allen Wellenlängen identisch. Das Aktionspektrum des NPQ und die Expression von LHCSR3 zeigen eine deutliche Abnahme im roten Spektrum des sichtbaren Lichtes. Dies deutet darauf hin, dass die Expression von LHCSR3 im blauen Licht effektiver erfolgt als im roten Licht. Die npq4-Mutante, welche kein LHCSR3 exprimiert, zeigt ein sehr geringes, beinahe flaches Niveau an NPQ. Dieser Stamm wurde daher als Negativkontrolle verwendet.

Diese Ergebnisse führten zu der Hypothese, dass möglicherweise ein Blaulichtrezeptor an der Induktion der Expression von LHCSR3 beteiligt sein könnte. Um dies zu überprüfen, wurden zwei bekannte Blaulichtrezeptor-Mutanten getestet. Dabei handelte es sich um eine Cryptochrom-Mutante ( $\Delta aCRY$  - animal-like cryptochrome) (Beel et al., 2012) und um eine Phototropin-Mutante ( $\Delta PHOT^{G5}$ ) (Zorin et al., 2009), beides funktional wichtige Blaulichtrezeptoren.

Die beiden Mutanten wurden mit demselben experimentellen Aufbau wie der Wildtypstamm 137C untersucht. Dabei konnten in der  $\Delta aCRY$  -Mutante vergleichbare NPQ-Level und spektrale Eigenschaften gemessen werden wie im Wildtypstamm (Abbildung 40 B). Hingegen zeigte sich in der  $\Delta PHOT$ -Mutante eine dramatische Abnahme des NPQ im blauen Spektrum des Lichtes, was eine direkte Abhängigkeit der LHCSR3 Expression von Phototropin wiedergibt.

Die Abhängigkeit der Induktion von LHCSR3 und des NPQ konnte auch in unabhängigen Experimenten im Weißlicht wiederholt und bestätigt werden (Abbildung 40 C).

Wie in der Einleitung beschrieben, besteht Phototropin aus zwei funktionalen Einheiten, einer N-terminalen Photorezeptordomäne (LOV1+LOV2) und einer C-terminalen Kinasedomäne. Um nun herauszufinden, welche dieser Domänen für die Signaltransduktion eine Rolle spielt, wurden verschiedene Phototropin-Komplementierungsmutanten getestet.

Im Folgenden werden die generierten Stämme des Volllängen-Phototropins als „Stammsname\_PHOT“ bezeichnet. Analog, wenn nur die LOV1+LOV2-Domänen exprimiert werden „Stammsname\_L1+L2“ und im Falle der Kinase-Domäne „Stammsname\_KIN“. Wird eine funktionale Domäne durch Mutagenese inaktiviert, so ist dies als durchgestrichene Bezeichnung markiert (~~L1+L2~~; ~~KIN~~). Eine Übersicht aller hergestellten und im Weiteren verwendeten Konstrukte ist im nächsten Kapitel in Abbildung 42 A gegeben. Dabei diente Plasmid (pLY-A) als Vorlage für die im Weiteren erstellten Expressionskonstrukte, welches von Yinghong Lu im Rahmen seiner Doktorarbeit hergestellt wurde. Für die Selektion und eine verbesserte Expression verwendete er die *PHOT* cDNA-Sequenz als Fusions mit einem 5' angefügten <sup>Sh</sup>BLE-Resistenzgen (Lu, 2006). Alle Konstrukte und Stämme wurden vor Ihrer Verwendung mittels Western-Blot-Analysen auf die korrekte Expression überprüft. Dazu wurden entweder Antikörper gegen den N-terminalen BLE-Marker (Anti-<sup>Sh</sup>BLE, Invivogen) oder falls im Konstrukt vorhanden, gegen die LOV1-Domäne (Anti-LOV1), eingesetzt.

Für die Analysen wurden verschiedene Konstrukte in der *PHOT*-Mutante ( $\Delta PHOT^{G5}$ ) überexprimiert und als Kontrolle Volllängen-Phototropin verwendet ( $\Delta PHOT^{G5}$ \_PHOT). Es wurden ferner Stämme generiert, welche entweder nur LOV1+LOV2 ( $\Delta PHOT^{G5}$ -L1+L2) oder nur die C-terminale Kinasedomäne ( $\Delta PHOT^{G5}$ \_KIN) exprimieren. Zudem erfolgte eine Überexpression der

Kinasedomäne (CC-125\_KIN) in einem Wildtypstamm mit normalen Levels an Phototropin (CC-125). Nach der Kultivierung der Wildtypstämme sowie der komplementierten Stämme für 4 Stunden bei starker Lichtintensität ( $250 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) fand die Analyse der Expression von LHCSR3 mittels Wester-Blot-Analysen statt. Das Proteinlevel von LHCSR3 im Stamm  $\Delta\text{PHOT}^{\text{G5}}_{\text{L1+L2}}$  war niedriger als im WT-Parentalstamm, der Stamm  $\Delta\text{PHOT}^{\text{G5}}_{\text{KIN}}$  zeigte hingegen ein höheres Level an detektiertem LHCSR3 (Abbildung 40 D). Zusammengefasst lassen diese Ergebnisse auf eine Regulation von LHCSR3 durch die Phototropin-Kinasedomäne schließen.

### 3.6.2 Phototropin reguliert die Augenfleckgröße

#### 3.6.2.1 Veränderlichkeit ist Blaulicht reguliert

Im folgenden Kapitel wird die von Boris Zorin generierte  $\Delta\text{PHOT}$ -Mutante G5 analysiert (Zorin et al., 2009). Die Analyse fand in Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl Zellbiologie von Prof. Georg Kreimer an der Universität Erlangen statt. Die Arbeitsgruppe von Prof. Kreimer analysierte hierbei die von mir generierten Komplementationsmutanten des  $\Delta\text{PHOT}^{\text{G5}}$  Stammes. Dies beinhaltet die Messungen an Augenflecken, sowie quantitative Westernblot-Analysen. Messungen des phototaktischen Verhaltens wurden von mir selbst durchgeführt. Die Ergebnisse wurden publiziert in:

*The Plant Cell November 2012 vol. 24 no. 11 4687-4702*

(Trippens et al., 2012)

Die Analyse der Augenfleckgröße von *C. reinhardtii* fand unter verschiedenen Wachstumsbedingungen statt. In vorangegangenen Studien wurde die Augenfleckgröße verschiedener *Chlamydomonas* Laborstämme verglichen, wobei sich Unterschiede heraus kristallisierten (Renninger et al., 2001; Kreimer, 2009). Zur näheren Differenzierung wurde eine genauere Analyse von acht verschiedenen *C. reinhardtii* Laborstämmen durchgeführt. Die Kultivierung unter Standardbedingungen in einem Tag-Nacht-Zyklus (14/10 h) ergab eine stammspezifische Augenfleckgröße von  $1,50 \pm 0,42 \mu\text{m}^2$  bis  $0,59 \pm 0,17 \mu\text{m}^2$ . Die kleinste Augenfleckgröße wurde an Zellen des  $\Delta\text{PHOT}^{\text{G5}}$  Parentalstammes (CW15-302) gemessen (Anhang Abbildung 51), die größte mittlere Augenfleckfläche in Stamm CC-621 mt-. Um die adaptive Veränderung des Augenflecks zu bestimmen, wurde die Augenfleckgröße von Stamm SAG7372 mt+ in drei verschiedenen Kulturmedien analysiert: Minimal Medium (MM), TAP mit Acetat als



Kohlenstoffquelle und Gametenmedium (NMM). Dabei konnte festgestellt werden, dass vegetative Zellen bei Zugabe von Acetat einen größeren Augenfleck bildeten. Es erhöhte sich außerdem die Augenfleckfläche um ~35% wenn die Zellen in NMM-Medium zu Gameten differenzieren.

In Versuchen mit der einzelligen Grünalge *Tetraselmis astigmatica*, die zu den Prasinophyceae gehört, konnte gezeigt werden, dass die Größe des Augenflecks bei der Kultivierung in Dunkelheit stark zunimmt. Anlässlich dieser Erkenntnis wurde nun getestet, ob die Augenfleckgröße auch in *Chlamydomonas* einer Lichtabhängigkeit unterliegt.

Wie in *T. astigmatica* konnte auch in *Chlamydomonas* eine Zunahme des Augenflecksfläche bei Dunkelkultivation festgestellt werden. Der Unterschied zu Zellen, kultiviert bei Schwachlicht ( $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ ), lag bei ungefähr 50%. Wurde die Lichtintensität auf  $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$  erhöht, reduzierte sich im Vergleich zum Schwachlicht die Fläche um 30% (Abbildung 41 A). Da davon auszugehen war, dass einer der Photorezeptoren aus *Chlamydomonas* bei der dynamischen Regulation der Augenfleckgröße beteiligt ist, wurde als nächstes untersucht, ob eine Wellenlängenabhängigkeit der Regulierung des Augenfleckes besteht. Belichtung der Zellen bei 660 nm, 595 nm, 520 nm, 470 nm und 405 nm ergab, dass blaues Licht im Bereich von 470 nm am effektivsten eine Reduktion der Augenfleckfläche bewirkt (Abbildung 41 B). Darüber hinaus konnte ebenfalls eine Reduktion der Augenfleckfläche mit zunehmender Belichtungsdauer gemessen werden (Abbildung 41 C) *Chlamydomonas* besitzt mehrere Photorezeptoren, die im blauen Spektralbereich absorbieren, ChR1, ChR2, zwei Cryptochrome und Phototropin. Alle drei kommen theoretisch als Photorezeptoren zur Regulation der Augenfleckgröße infrage.

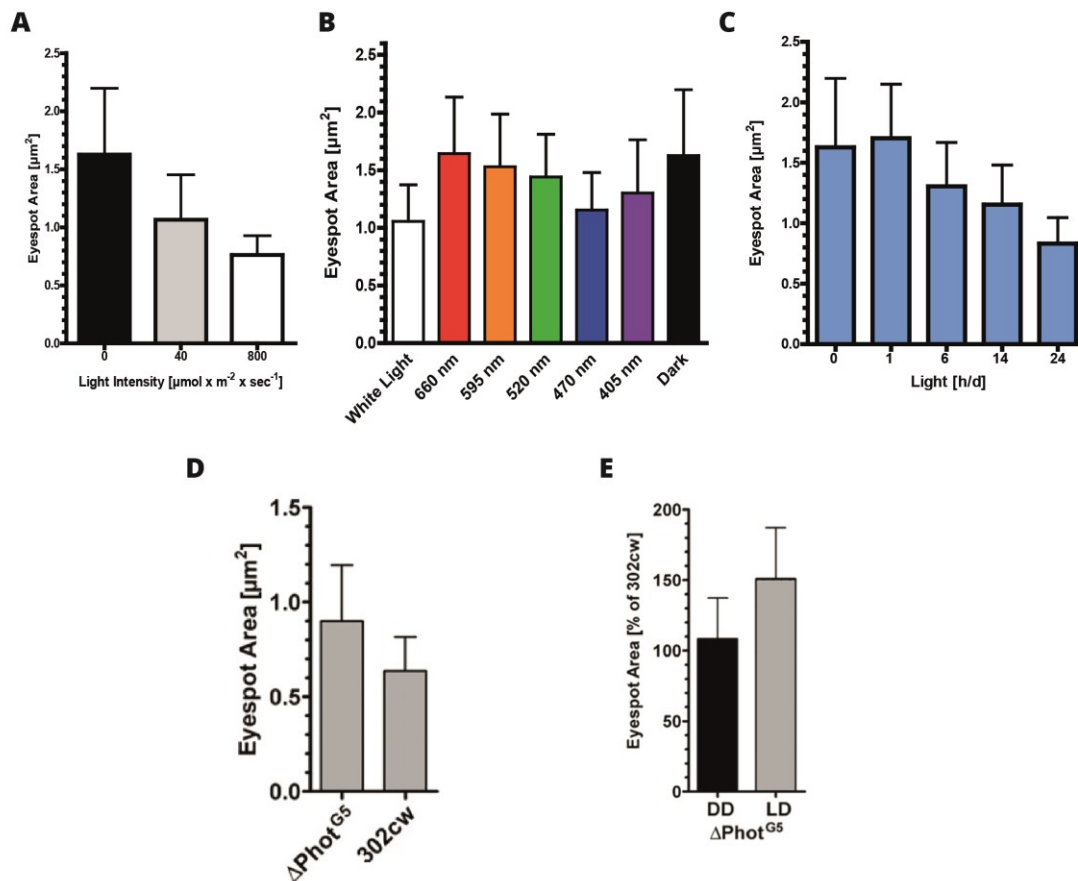


Abbildung 41 Lichtabhängigkeit der Augenfleckgröße

(A) Quantifizierung der Augenfleckflächen in Stamm SAG73.72 mt+. Anzucht der Kulturen erfolgte im Dunkeln oder mit den angegebenen Lichtintensitäten in einem 14h / 10h Licht-Dunkel-Zyklus. (Mittelwerte, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung; n = 234 Zellen (Dunkel) und n = 243 Zellen (40  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) und 313 Zellen (800  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), die Differenzen sind signifikant (one-way ANOVA,  $P < 0.0001$ ). (B) Kulturbedingungen wie in (A) bei den angegebenen Wellenlängen. Signifikante Änderungen der Augenfleckgröße traten nur bei 405nm, 470nm und Weißlicht auf. (C) Quantifizierung der Augenfleckflächen in Stamm SAG73.72 mt+. Anzucht der Kulturen erfolgte für 6 Tage im Dunkeln oder in einem Licht-Dunkel-Zyklus mit den angegebenen Stundenzahlen an Blaulicht (470nm). (D) Quantifizierung der Augenfleckflächen in Stamm CW15-302 und  $\Delta\text{PHOT}^{\text{G5}}$ . Anzucht der Kulturen erfolgte im Standard Licht-Dunkel-Zyklus. (E) Augenfleckfläche von  $\Delta\text{PHOT}^{\text{G5}}$  im Vergleich zum Parentalstamm. Beide Stämme wurden für 5 Tage im Dunkeln (DD) und anschließend in einem Licht-Dunkel-Zyklus kultiviert (LD). Die Messungen erfolgten am Ende der Dunkelkultivation sowie nach 5 Tagen im Licht-Dunkel-Zyklus.

Da nicht für alle der vorher genannten Photorezeptoren eine Deletionsmutante zur Verfügung stand, fokussierte sich die Analyse auf die COP3-Deletionsstämme  $\Delta\text{Cop3}^{\text{H2}}$  und  $\Delta\text{Cop3}^{\text{H4}}$  (ZF37-H2 und -H4) sowie den von B. Zorin generierten Phototropin Deletionsstamm. Messungen an  $\Delta\text{Cop3}^{\text{H2}}$  und  $\Delta\text{Cop3}^{\text{H4}}$  ergaben keine signifikanten Unterschiede in der Augenfleckgröße ( $\Delta\text{Cop3}^{\text{H2}}$ ,  $0.53 \pm 0.12 \mu\text{m}^2$ , n = 83;  $\Delta\text{Cop3}^{\text{H4}}$ ,  $0.52 \pm 0.11 \mu\text{m}^2$ , n = 96; 302cw,  $0.52 \pm 0.12 \mu\text{m}^2$ , n = 89). Hingegen zeigte der Phototropin Deletionsstamm  $\Delta\text{PHOT}^{\text{G5}}$  eine deutliche Vergrößerung des Augenflecks im Vergleich zum parental Stamm CW15-302 (Abbildung 41 D). Wurden CW15-302 und  $\Delta\text{PHOT}^{\text{G5}}$  im Licht kultiviert und anschließend für fünf Tage in Dunkelheit gehalten, zeigte  $\Delta\text{PHOT}^{\text{G5}}$  keine Veränderung der Augenfleckfläche. Hingegen vergrößerte sich die Fläche von

CW15-302 auf das Niveau von  $\Delta PHOT^{G5}$ . Mittels dieser Versuche konnte belegt werden, dass Phototropin der Photorezeptor für die lichtaktivierte Größenreduktion des Augenfleckes ist.

Um diese Annahme zu bekräftigen, wurden Komplementierungsexperimente durchgeführt zur Reduktion der Augenfleckgröße durch Überexpression von  $^{Cr}PHOT$  in Stamm  $\Delta PHOT^{G5}$ . Da Phototropin aus mehreren funktionalen Domänen aufgebaut ist, soll ferner bestimmt werden, welche davon für die Regulation verantwortlich ist.

#### 3.6.2.2 Regulation durch die Kinase

Untersuchungen an Vollängen-Phototropin in *Arabidopsis* haben gezeigt, dass sowohl die photochemische Reaktion der beiden LOV-Domänen, als auch eine funktionale Kinase-Domäne notwendig sind, um eine physiologische Reaktion hervor zu rufen (Briggs et al., 2001; Christie et al., 2002; Kong et al., 2006). Hingegen kann die Kinase-Domäne alleine lichtunabhängige Reaktion auslösen (Kong et al., 2007). Stamm  $\Delta PHOT^{G5}$  wurde mit Plasmid-DNA transformiert welches das codierende Gen für  $^{Cr}PHOT$  enthielt.

Die Überexpression des Ble:PHOT Fusionsproteins in Stamm  $\Delta PHOT^{G5}$  konnte durch Western-Blot-Analysen bestätigt werden (Abbildung 42). Wie in der Arbeit von Yinghong Lu gezeigt, wurden auch hier C-terminale Degradationsprodukte detektiert. Das Vollängen-Protein wies dabei ein Molekulargewicht von 94 kD auf. Ebenfalls gelang die Detektion des von Pfeiffer et al. (2010) beschriebenen, etwa 20 kD kleineren Degradationsprodukts (PHOT $\Delta$ 20). Durch Inaktivierung der beiden LOV-Domänen ist es möglich, den proteolytischen Abbau zu inhibieren.

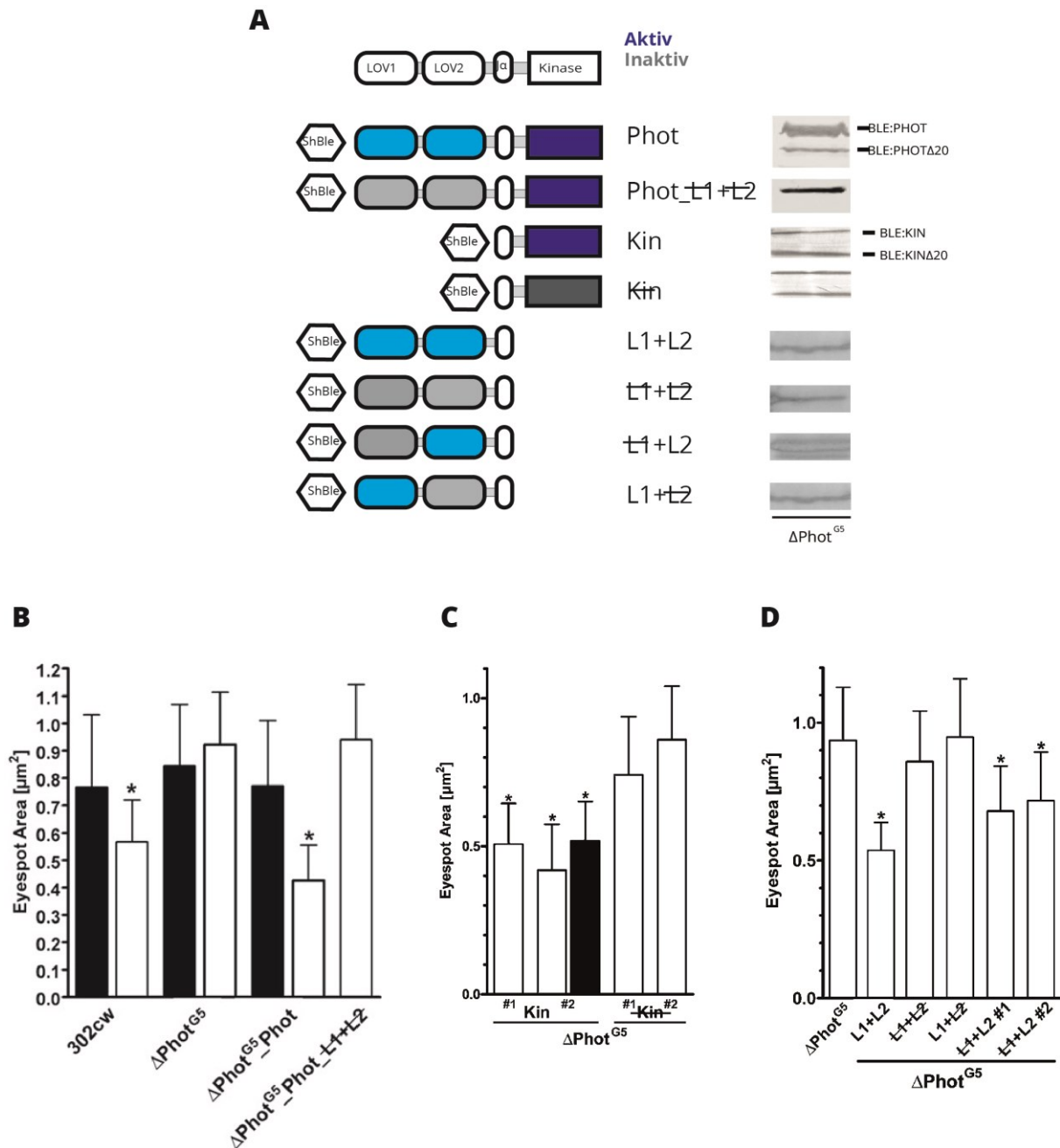


Abbildung 42 Komplementierung von  $\Delta PHOT^{G5}$

(A) Schematische Darstellung der verwendeten Phototropin-Konstrukte. Aktive Domänen in Blau. Inaktivierte Domänen in Grau. Western-Blot-Analysen der Fusionsproteine. Es wurde entweder ein Anti-LOV1-Antiserum (Kanninchen; 1:2000) oder für Konstrukte ohne LOV1-Domäne (BLE:KIN) ein Anti-ShBLE-Antiserum (Kanninchen; 1:2000) verwendet. (B) Quantifizierung der Augenleckgröße in CW15-302,  $\Delta PHOT^{G5}$  und den komplementierten Stämmen  $\Delta PHOT^{G5}_{PHOT}$  und  $\Delta PHOT^{G5}_{PHOT_{L1+L2}}$ . Anzucht der Kulturen erfolgte im Dunkeln (Schwarze Balken) oder in einem 14h / 10h Licht-Dunkel-Zyklus (weiße Balken). Mittelwerte, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung; \* one-way ANOVA,  $P < 0.0001$ . (C) Quantifizierung der Augenleckgröße in  $\Delta PHOT^{G5}_{KIN}$  und der Negativkontrolle  $\Delta PHOT^{G5}_{KIN}$ . Anzucht der Kulturen erfolgte für 4d im Dunkeln (schwarzer Balken), oder in einem 14h / 10h Licht-Dunkel-Zyklus (weiße Balken). Mittelwerte, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung; \* one-way ANOVA,  $P < 0.0001$ . (D) Quantifizierung der Augenleckgröße in  $\Delta PHOT^{G5}$  und L1+L2 komplementierten Stämmen. Inaktivierte Domänen sind als durchgestrichen markiert. Anzucht der Kulturen erfolgte im Standard 14h / 10h Licht-Dunkel-Zyklus.

Komplementierte Zellenlinien des Stammes  $\Delta PHOT^{G5}_{PHOT}$ , die in einem Tag-Nacht-Zyklus kultiviert wurden, zeigten eine wiederhergestellte Regulation der Augenleckgröße. Messung des

Parentalstamms CW15-302 ergaben vergleichbare Werte. Erfolgte die Anzucht im Dunkeln, vergrößerte sich die Fläche auf dasselbe Niveau wie bei  $\Delta PHOT^{G5}$  und CW15-302 (Abbildung 42 B). Stamm  $\Delta PHOT^{G5}$ \_PHOT\_L1+L2—wurde zuvor mit einem nicht-photoaktiverbaren Volllängen-Phototropin transformiert und diente als Kontrolle. Der resultierende Stamm zeigte keine lichtabhängige Änderung der Augenfleckgröße. Mit diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass durch Komplementierung des Phototropin-Gens im Deletionsstamm  $\Delta PHOT^{G5}$  die lichtabhängige Regulation der Augenfleckgröße wiederhergestellt werden kann.

Als nächstes wurde untersucht, ob eine der beiden funktionalen Einheiten ausreicht, um den Regulationsprozess des Augenflecks auszulösen. Über die genaue Funktionsweise von Phototropin ist bisher wenig bekannt, allgemein wird angenommen, dass die LOV-Domänen als Lichtregulatoren der Kinasedomäne fungieren. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde die Kinasedomäne ohne LOV1+2 im Deletionsstamm exprimiert.

Wie auch schon für *A. thaliana* gezeigt (Kong et al., 2007), führt die Expression der Kinase in *C. reinhardtii* zu einer lichtunabhängigen Reaktion. Zellen der Stämme  $\Delta PHOT^{G5}$ \_KIN (#1 + #2) hatten, unabhängig von der Belichtung, kleine Augenflecken ( $\sim 0,5 \mu m^2$ ). Auch hier dienten als Kontrolle nicht-funktionelle Mutanten der Kinasedomäne exprimiert in  $\Delta PHOT^{G5}$ . Durch Mutation von Aspartat-547 zu Asparagin wird die koordinative Bindung von  $Mg^{2+}$ -ATP im Aktivenzentrum der Kinase verhindert und führt zu einem Funktionsverlust. Stamm  $\Delta PHOT^{G5}$ \_KIN#1 zeigte keine Veränderung der Augenfleckgröße. Das gleiche Resultat wurde erzielt durch Substitution von Ser-611 ( $\Delta PHOT^{G5}$ \_KIN#2) durch ein Arginin. Die Ursache hierfür konnte bereits in *A. thaliana* gezeigt werden. Es findet eine Autophosphorylierung an dieser Position statt, ohne die Phototropin einen Aktivitätsverlust erleidet (Inoue et al., 2008). Die Größe der Augenflecke dieser beiden komplementierten Stämme lag auf dem Niveau von  $\Delta PHOT^{G5}$  (Abbildung 42 C).

### 3.6.2.3 Regulation durch LOV1+LOV2

Von den beiden LOV-Domänen des Phototropins wird angenommen, dass sie unterschiedliche Funktionen ausüben. Die LOV1-Domäne ist für die Dimerisierung der Phototropine verantwortlich und fungiert als ein Aktivitätsregulator. LOV2 hingegen ist der primäre Regulator der Lichtaktivierung und ist für die Derepression der Kinasedomäne verantwortlich (Demarsy and Fankhauser, 2009). Lu beschrieb in seiner Arbeit eine lichtabhängige Degradation des *Chlamydomonas* Vollängen-Phototropins in eine 20kDa kleinere (PHOT $\Delta$ 20) Spezies (Lu, 2006). Da es sich um einen C-terminalen Abbau handelt, welches eine weitere Funktionalität der Kinasedomäne unwahrscheinlich macht, stellte sich die Frage nach einer möglichen Funktionalität dieses Abbauproduktes. Sollte eine Interaktion von LOV1+2 mit anderen Proteinen stattfinden, könnte das verbliebene C-terminale Fragment eine lichtabhängige Blockierung der LOV-Domänen bewirken. Dies würde eine Umkehr der bisher bekannten lichtabhängigen Regulation der Kinase darstellen. Diese Lichtabhängigkeit könnte allerdings die Interpretation und Identifikation eines Phänotyps erschweren. Daher wurde zunächst der Einfluss von LOV1+2, ohne C-terminales Fragment, auf die Augenfleckgröße untersucht. Interessanterweise wurde auch in Stamm  $\Delta$ PHOT<sup>G5</sup>\_L1+L2 eine Reduktion der Augenfleckgröße gemessen (Abbildung 42 D). Die Stämme  $\Delta$ PHOT<sup>G5</sup>\_L1+L2 und  $\Delta$ PHOT<sup>G5</sup>\_L1+L2 zeigten diesen Phänotyp nicht. Wurde hingegen nur LOV1 inaktiviert ( $\Delta$ PHOT<sup>G5</sup>\_L1+L2), wiesen die gemessenen Zellen eine intermediäre Reduktion der Augenfleckfläche auf. Mit diesen Experimenten wurde gezeigt, dass die N-terminalen Photorezeptordomänen einen Signalprozess initiieren können, der eine lichtabhängige Reduktion der Augenfleckgröße bewirkt. Wie bereits an der Aktivität des Vollängen-Phototropin festgestellt (Briggs et al., 2001; Christie et al., 2002), scheint auch hier aktives LOV2 für eine initiale Signaltransduktion verantwortlich zu sein und LOV1 die Rolle eines Signalattenuators inne zu haben.

### 3.6.2.4 Phototropin Überexpression

Der Phototropin-Deletionstamm  $\Delta$ PHOT<sup>G5</sup> sowie dessen Parentalstamm CW15-302 besitzen keine Flagellen. Um stammspezifische Effekte der Überexpression von Phototropin auszuschließen und zu einem späteren Zeitpunkt den Einfluss der Phototropin-abhängigen Augenfleckregulation auf die Phototaxis zu untersuchen, wurden die verwendeten Konstrukte ebenfalls in motilen Stämmen mit endogen exprimiertem PHOT analysiert. Stamm MS325 ist eine Rückkreuzung von CW15-302 in einen motilen Stamm. CC-125 ist einer der ursprünglichen Wildtypstämme und wird oft für physiologische Experimente verwendet. Zuerst wurde bei beiden Stämmen die

---

Augenfleckgröße bestimmt. MS325 zeigte dabei eine intermediäre Augenfleckgröße und CC-125 etwas größere Augenflecke (Anhang Abbildung 51). Die Überexpression von L1+L2 in MS325 führte zu einer durchschnittlichen Augenfleck-Verkleinerung um ~ 30%. Als Kontrolle wurde wieder *PHOT\_L1+L2* exprimiert, was jedoch zu keiner Änderung führte. Die Überexpression der Kinase erfolgte in CC-125 mt+ und führte zu Zellaggregaten von zwei oder mehr Zellen innerhalb der mütterlichen Zellwand (engl.: palmelloids). Dieser Phänotyp spricht für einen Einfluss von PHOT auf den Abbau der mütterlichen Zellwand nach der Zellteilung welcher bereits in einer früheren Studie gezeigt wurde (Huang and Beck, 2003). *PHOT* knockdown-Experimente einer weiteren Studie belegten, dass Transkripte, die für ein Glykoprotein der Zellwand (GP2) codieren, herunterreguliert sind (Im et al., 2006). Die Überexpression führte in CC-125\_KIN ebenfalls zu einer durchschnittlichen Reduktion der Augenfleckgröße um ~ 30% im Vergleich zum Wildtyp (CC-125,  $1.20 \pm 0.39 \mu\text{m}^2$ , n = 111; CC-125\_KIN,  $0.84 \pm 0.21 \mu\text{m}^2$ , n = 122; Student's t test,  $P < 0.0001$ ).

#### 3.6.2.5 Regulation von Kanalrhodopsin-1

Mittels der bisherigen Versuche wurde gezeigt, dass Phototropin an der Regulation der Augenfleckgröße beteiligt ist. Da die beiden Kanalrhodopsine (ChR1 + ChR2) im Augenfleck lokalisiert sind (Berthold et al., 2008), oder genauer gesagt in der Plasmamembran über den Karotenoidvesikeln, sollte nun untersucht werden, ob die Größe der Augenfleckfläche mit der Menge an Kanalrhodopsin Protein korreliert. Dazu wurde  $\Delta PHOT^{G5}$  und CW15-302 unter verschiedenen Lichtbedingungen kultiviert und mittels Western-Blot-Analysen die Menge der vorhandenen Kanalrhodopsin-Proteine in den Rohextrakten quantifiziert. Bei einer geringen Lichtintensität ( $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) war die Menge an Kanalrhodopsin-1 in beiden Stämmen identisch. Eine erhöhte Lichtintensität führte im Stamm CW15-302 zu einer steilen Abnahme von ChR1. Bei  $110 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  reduzierte sich die Menge um ~ 85%. Eine weitere Erhöhung der Lichtintensität führte zu keiner weiteren Veränderung der ChR1-Proteinmenge. Der Phototropin defiziente Stamm  $\Delta PHOT^{G5}$  zeigte, ausgehend vom Startniveau, erst ab einer Lichtintensität von  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  eine Reduktion der ChR1-Menge (Abbildung 43 A). Die Reduzierung der Augenfleckgröße bei Belichtung (~ 50%) in CW15-302 korreliert hierbei nicht mit dem Abfallen des ChR1-Gehaltes (~ 85%). Die Annahme, dass keine direkte Korrelation besteht, wird auch durch die Beobachtungen an  $\Delta PHOT^{G5}$  gestützt, da hier die Augenfleckfläche konstant bleibt, während sich der ChR1-Gehalt reduziert. Zusammengefasst zeigen diese Experimente, dass kein linearer Zusammenhang zwischen Augenfleckgröße und ChR1-Gehaltes besteht.

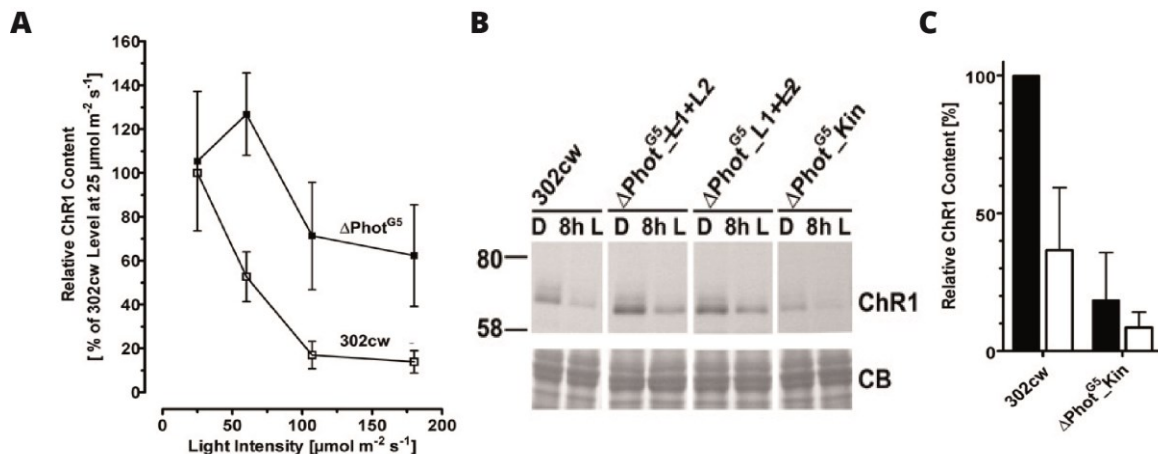


Abbildung 43 Lichtabhängige Regulation der ChR1-Proteinmenge

(A) Quantitative Auswertung von Western-Blot-Analysen zur Bestimmung der ChR1-Proteinmenge unter steigenden Lichtintensitäten. Vergleich des ChR1-Gehaltes aus den Rohextrakten der Kulturen CW15-302 (302cw) und  $\Delta\text{PHOT}^{\text{G5}}$ , welche mit den angegebenen Lichtintensitäten kultiviert wurden. Es fanden drei unabhängige Wiederholungen der Experimente statt. (B) Vergleich der ChR1-Menge in CW15-302 und verschiedener LOV bzw KIN komplementierter  $\Delta\text{PHOT}^{\text{G5}}$ -Stämme. (C) Vergleich der ChR1-Menge in CW15-302 und  $\Delta\text{PHOT}^{\text{G5}}_{\text{KIN}}$  im Licht und im Dunkeln.

Um weitere experimentelle Daten für diese Annahme zu erhalten, wurde auch in  $\Delta\text{PHOT}^{\text{G5}}_{\text{L1+L2}}$ ,  $\Delta\text{PHOT}^{\text{G5}}_{\text{L1+L2}}$  und  $\Delta\text{PHOT}^{\text{G5}}_{\text{KIN}}$  der ChR1-Gehalt quantifiziert. Die Überexpression der LOV-Domänen hatte keinen Einfluss auf den ChR1-Gehalt (Abbildung 43 B). Hingegen bewirkte die Überexpression der Kinase bereits eine starke Reduzierung von ChR1 im Dunkeln. Bei Belichtung trat eine weitere Reduzierung des ChR1-Gehaltes auf, was auf einen zusätzlichen lichtabhängigen regulatorischen Mechanismus hindeutet (Abbildung 43 C).

Als Nächstes sollte festgestellt werden, ob sich, wie für ChR1 gezeigt, auch die Menge an ChR2 Phototropin abhängig verändert. Interessanterweise zeigte sich in Stamm  $\Delta\text{PHOT}^{\text{G5}}_{\text{KIN}}$  keine Reduzierung des Proteinlevels an ChR2 (Abbildung 44 A). Im Vergleich zum Wildtyp zeigte sich sogar eine geringe Zunahme an ChR2. Diese Beobachtung könnte darauf hindeuten, dass ein Verlust an ChR1 eventuell durch eine erhöhte Expression an ChR2 ausgeglichen wird. Eine solche Erhöhung wurde bereits in einer früheren Studie für einen ChR1-knockdown Stamm festgestellt (Govorunova et al., 2004). Um zu prüfen, ob tatsächlich ein Ausgleich des ChR1 Verlustes durch eine erhöhte ChR2 Expression erfolgt, wurden Rohextrakte der beiden ChR1-Deletionsstämmen ( $\Delta\text{COP}^{\text{H2}}$  und  $\Delta\text{COP}^{\text{H4}}$ ) in Western-Blot-Analysen (Labor Prof. Georg Kreimer) mit Anti-ChR2-Antiserum hybridisiert. Es erfolgten drei unabhängige Experimente, in denen nur sehr geringe Änderungen des ChR2-Gehaltes festgestellt werden konnten (Abbildung 44 B). Die Quantifizierung der Proben aus unbelichteten Kulturen ergab in den Deletionsstämmen eine Erhöhung des ChR2-Gehaltes von lediglich ~ 6-8% im Vergleich zum Wildtypstamm. Wie zuvor bei ChR1 zeigt sich auch



bei Chr2 keine Korrelation mit der diurnalen Änderung der Augenfleckgröße ( $\pm 30\%$ , Abbildung 42 B).

Da auf Proteinebene die Änderungen aufgrund der geringen Differenz schwer zu quantifizieren sind, wurden noch einmal die Daten der RNA-Seq-Experimente (Kapitel 3.5) heran gezogen. Zuvor lag das Augenmerk auf der Änderung der absoluten Transkriptmenge. Um nun eine mögliche Regulation durch Phototropin zu untersuchen, wurden die relativen Änderungen der Transkriptmengen betrachtet, da sich eine unterschiedliche Regulation von Chr2 auch auf dieser Ebene äußern könnte. Um diese Änderungen zu betrachten, wurden alle Werte auf  $\text{RPKM}^{\text{MAX}}$  - normalisiert ( $\text{RPKM}^{\text{MAX}} / \text{RPKM}$ ) (Abbildung 44 C). Die so erstellten Diagramme, zeigen die relativen Änderungen der Transkriptmengen an den Übergängen von DP/LP und LP/DP. Wie zu sehen ist, zeigen die Kurven einen nahezu identischen Kurvenverlauf.

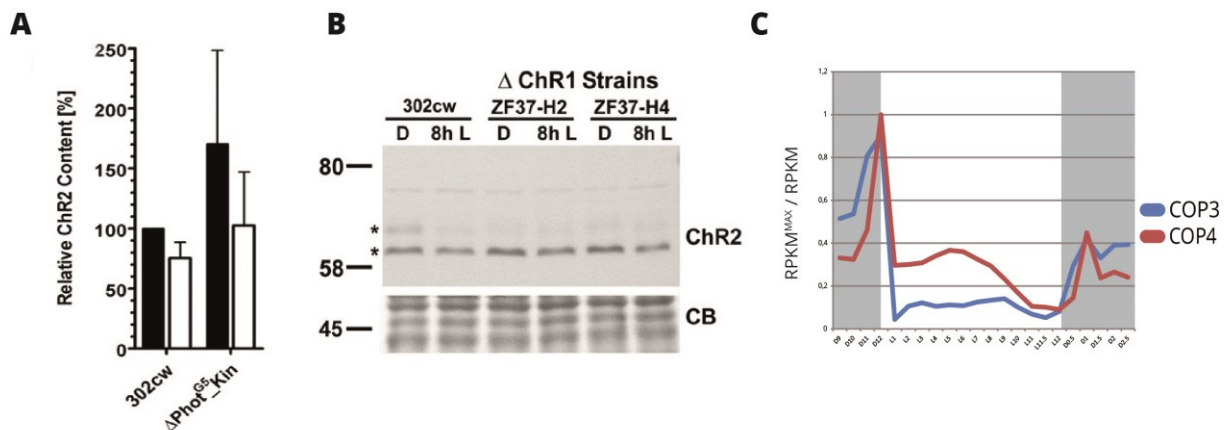


Abbildung 44 Analyse des Chr2-Gehaltes in  $\Delta\text{COP3}$

(A) Die Expression der Kinase in  $\Delta\text{PHOTG5\_KIN}$  führt zu keiner Reduktion an Chr2. (B) Die Chr2-Expression ändert sich nur geringfügig in den Chr1-Deletionsstämmen ( $\Delta\text{COP3}^{\text{H2}}$  und  $\Delta\text{COP3}^{\text{H4}}$ ). „D“ Zellextrakte Ende der Dunkelpphase; „8h L“ nach 8 Stunden Belichtung. (C) Relative Änderung der Transkriptmenge von COP3 und COP4 während eines Licht-Dunkel-Zyklus. Dargestellt ist die relative Änderung  $\text{RPKM}^{\text{MAX}} / \text{RPKM}$ .

#### 3.6.2.6 Phototaxis

Da in den bisherigen Experimenten nachgewiesen wurde, dass Phototropin sowohl die Augenfleckgröße als auch den ChR1-Gehalt beeinflusst, wurden auch die damit einhergehenden Änderungen im phototaktischen Verhalten analysiert (eigene Durchführung). Stamm  $\Delta PHOT^{G5}$  sowie der Parentalstamm CW15-302 konnten aufgrund nicht vorhandener Flagellen nicht analysiert werden. Alle bisherigen Versuche Stamm  $\Delta PHOT^{G5}$  mit motilen Stämmen zu kreuzen resultierten in nicht-motilen Stämmen (E. Checkunova und persönliche Mitteilung Prof. James Umen). Folglich kann es nicht ausgeschlossen werden, dass Phototropin ebenfalls an der Ausbildung der Flagellen beteiligt ist. Um dennoch die Analyse des Einflusses von PHOT auf die Phototaxis realisieren zu können, wurde hier auf eine Überexpression der bereits verwendeten Phototropin-Konstrukte in Wildtypstämmen zurückgegriffen. Für ein gleichmäßiges phototaktisches Verhalten der Kulturen wurden Gameten in allen Messungen verwendet. Gameten des Stammes CC-125 zeigten eine normale Phototaxis. Blaulicht (470nm) löste eine positive Phototaxis aus und UV-Licht (405nm) induzierte eine negative Phototaxis. Licht- und Dunkeladaptation änderten nichts an der Ausrichtung der phototaktischen Vorzeichen, lediglich die Sensitivität der dunkeladaptierten Kulturen war leicht reduziert (Abbildung 45 A). Die Überexpression der Kinasedomäne in diesem Stamm (CC-125\_KIN) führte bei Belichtung mit blauem Licht zu einem Wechsel des phototaktischen Vorzeichens von positiv zu negativ. Während die Reaktion auf UV-Licht sehr gering verlief, war das Verhalten nach der Licht-Dunkel-Adaption auffällig. Im Gegensatz zum Wildtypstamm wurde hier keine reduzierte Sensitivität der dunkeladaptierten Kultur gemessen (Abbildung 45 B).

Die zuvor durchgeführten Messungen der Augenfleckgröße zeigten überraschenderweise auch eine Reduktion der Augenfleckfläche bei Überexpression der LOV-Domänen. Aus diesem Grund sollten auch hier mögliche Änderungen des phototaktischen Verhaltens überprüft werden. Eine Exprimierung der Konstrukte in Stamm CC-125 konnte nicht umgesetzt werden, mögliche Ursache könnte das Vorhandensein einer Zellwand in diesem Stamm sein, weil auch bei Überexpression der Kinasedomäne Probleme beim Abbau der Zellwand nach der Zellteilung beobachtet wurden. Ebenfalls als Ursache kommt eine Beteiligung an der Regulation des Zellzyklus in Betracht. Da die Expression in Stamm  $\Delta PHOT^{G5}$  nur unter Verwendung eines Tag-Nacht-Zyklus gelang und die Selektion auf Antibiotikum nur wenige Transformanten generierte, könnte die geringe Transformationseffizienz in CC-125 eine Selektion verhindert haben. Aufgrund dieser Problematik wurde der motile und zellwandlose Stamm CC-3403 für die Expression der LOV-Konstrukte verwendet. Kontrollmessungen an CC-3403 ergaben eine negative phototaktische Antwort bei der ersten Belichtung. Anschließend verhielt sich dieser analog zu CC-

125 (Abbildung 45 C). Unterschiede im phototaktischen Verhalten während der ersten Sekunden der Belichtung wurden schon für andere Stämme beschrieben und sind keine Seltenheit bei *C. reinhardtii* (H. Harris, 2008). Wie auch bei CC-125\_KIN war die phototaktische Antwort des Stammes CC-3403\_L1+L2 invertiert. Interessanterweise zeigten dunkeladaptierte Kulturen eine verzögerte erste Antwort auf Blaulicht, welche bei der zweiten Applikation von Blaulicht nicht mehr auftrat (Abbildung 45 D). Dies deutet daraufhin, dass L1+L2 mit den endogen vorhandenen PHOT-Kinasedomänen interagieren und/oder weitere Interaktionspartner existieren. Um diese Hypothese zu untersuchen wurden die nicht photoaktivierbaren LOV-Domänen (L1+L2), welche den Dunkelzustand imitieren, in CC-3403 exprimiert. Lichtadaptierte Zellen des Stammes CC-3403\_L1+L2 zeigten ebenfalls eine Inversion der phototaktischen Orientierung (Abbildung 45 E). Dunkeladaptation führte hingegen fast zum vollständigen Verlust der Phototaxis. Durch die Dunkeladaptation kann eine vorherige Interaktion mit endogenem Phototropin ausgeschlossen werden, welche zu einer Inaktivierung der Kinasdomäne hätte führen können. Dieses Ergebnis deutet eher auf eine Interaktion von L1+L2 mit Substraten im Dunkelzustand hin, was zu einer Inhibition der Phototaxis führte.

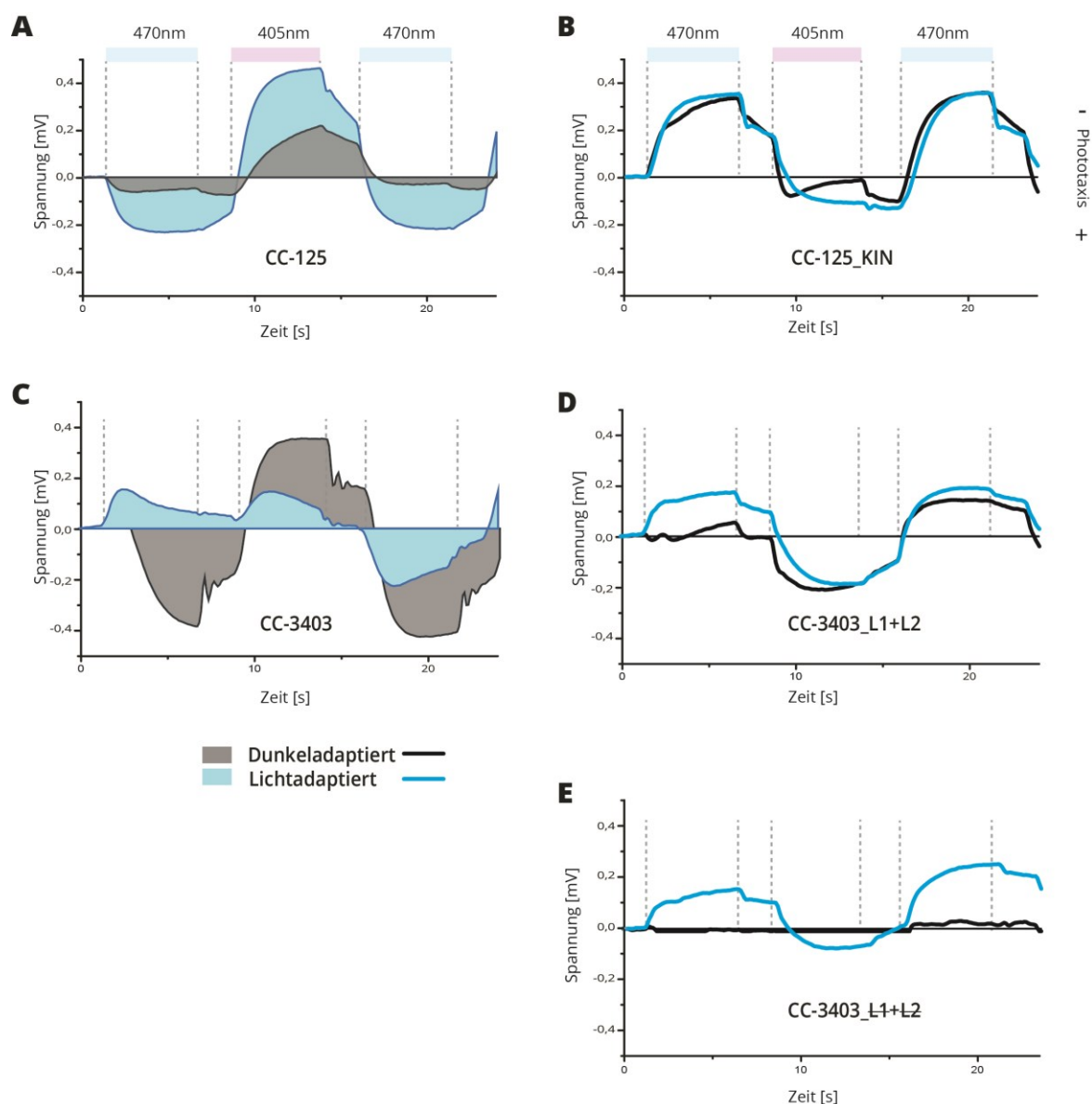


Abbildung 45 Phototaxis

(A) Lichtstreuemessungen des Wildtypstamms CC-125 zeigen eine normale phototaktische Reaktion. Blaues Licht (470nm) verursacht eine positive Phototaxis, hingegen wird durch starkes UV-Licht (405nm) eine negative phototaktische Bewegung hervorgerufen. Dunkel adaptierte Kulturen zeigen eine geringere Amplitude der gemessenen phototaktischen Reaktion, die Phasen sind jedoch identisch. Die Belichtung erfolgt durch LEDs der Wellenlängen 470nm und 405nm für jeweils 5s mit einer 2s Pause zwischen den Intervallen. Überexpression der  $\text{C}^{\text{PHOT}}$ -Kinase in CC-125 (CC-125\_KIN) führt zu einer negativen phototaktischen Reaktion nach Applikation von Blaulicht. Die Unterschiede zwischen licht- und dunkeladaptierten Kulturen, wie sie im Wildtypstamm vorkommen, sind in CC-125\_KIN nicht vorhanden. Belichtung mit UV-Licht löst nur eine geringe phototaktische Antwort aus. (B) L1+L2 Überexpression in CC-3403 (CC-3403\_L1+L2) führt zu einer Inversion der phototaktischen Antworten. CC-3403 als Kontrolle. Die Unterschiede in der phototaktischen Reaktion sind nur während der ersten Belichtungsphase zu erkennen. (C) Überexpression der inaktivierten LOV-Domänen (L1+L2) führt in dunkeladaptierten Zellen zu einer Repression der Phototaxis. Licht-adaptierte Zellen zeigen ebenfalls eine Inversion der phototaktischen Reaktion im Vergleich zum Wildtypstamm.

### 3.7 Charakterisierung von $\Delta COP3$

Während der Arbeiten zur Deletion von ChR1 in einem motilen Stamm wurde in einer durch Insertionsmutagenese erstellten Bibliothek ein *COP3*-Deletionsstamm gefunden. Diese Mutante wurde im Labor von Prof. Niyogi (UC Berkley) generiert und uns für Messungen der Phototaxis zur Verfügung gestellt.

Für die Analyse des phototaktischen Verhaltens wurde die zuvor beschriebene Methode der Lichtstreuung verwendet (Kapitel 3.6.2.6). Die Lichttitrations-Experimente wurden mit Wellenlängen von 455nm, 505nm und 530nm durchgeführt (Abbildung 46 A). Bei 455nm und 505nm zeigte die *COP3*-Deletionsmutante eine deutlich reduzierte phototaktische Antwort. Die gemessenen Signalstärken lagen bei ungefähr 30% verglichen mit dem Wildtyp-WT4a. Bei 530nm konnte im Deletionsstamm nur noch bei 100% Lichtintensität eine phototaktische Reaktion ausgelöst werden (Abbildung 46 A). Die erstellte Dosis-Effekt-Kurve von WT4a zeigte ein Maximum für alle drei Wellenlängen bei einer Lichtintensität von ungefähr  $9 \times 10^{19}$  Photonen/m<sup>2</sup>s. In WT4a- $\Delta COP3$  lösten auch höhere Intensitäten nur noch eine geringe phototaktische Antwort aus (Abbildung 46 B).

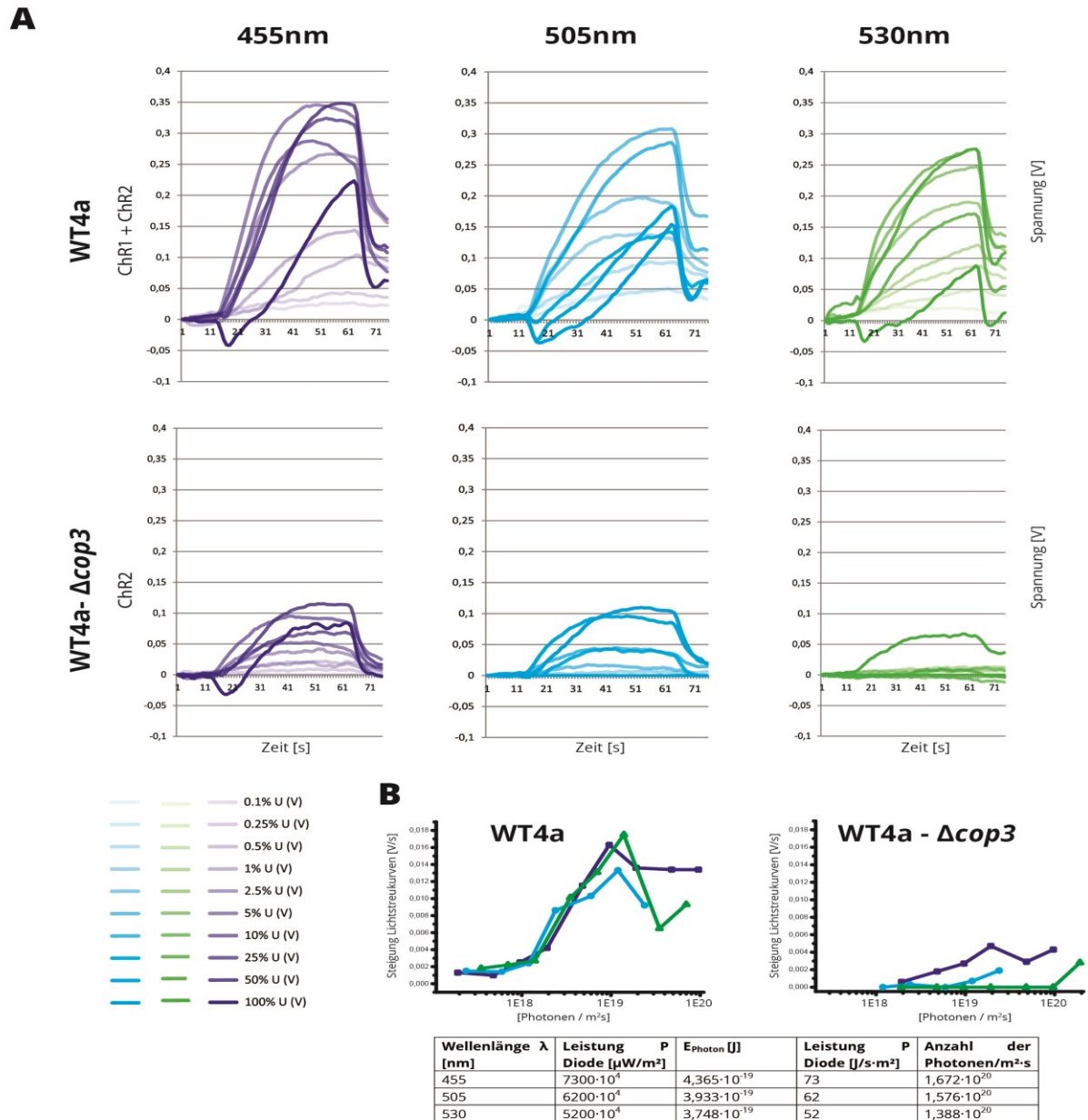


Abbildung 46 Phototaktisches Verhalten einer motilen  $\Delta\text{COP3}$ -Mutante

(A) Lichtstrommessungen der COP3-Deletionsmutante WT4a- $\Delta\text{COP3}$  und des Parentalstammes WT4a. WT4a zeigt die typischen Antworten auf Applikation von blauem und grünem Licht (455nm, 505nm und 530nm). Die maximale Reaktion tritt bei niedrigen Intensitäten von 5-10% auf. WT4a- $\Delta\text{COP3}$  zeigt nur eine Reaktion bei hohen Intensitäten der Wellenlängen 455nm und 505nm. Bei 530nm konnte nur noch bei 100% Intensität eine kleine Reaktion induziert werden. Links unten: Darstellung der in den Diagrammen verwendeten Farbcodierung. (B) Aufgrund der unterschiedlichen Leistungen der verwendeten LEDs wurde deren Leistung gemessen und daraus die Anzahl an Photonen/ $\text{m}^2\cdot\text{s}$  errechnet. Dies ermöglicht den direkten Vergleich der phototaktischen Antworten in einer sogenannten „Dosis-Effekt-Kurve“.

## 4. Diskussion

### 4.1 Zinkfinger-Nukleasen für die Deletion von *COP3*

Mit den durchgeführten Experimenten konnte bestätigt werden, dass die Anwendung der ZFN-Technologie in *Chlamydomonas* möglich ist und spezifische Deletionen oder Insertionen in einem Zielgen erfolgreich vorgenommen werden können. Die genetische Manipulation von *C. reinhardtii* ist sowohl für wissenschaftliche Anwendungen als auch für biotechnologische Applikationen von großer Bedeutung. Das hier vorgestellte Modellsystem, welches auf der Reparatur eines Markergens beruht, ermöglichte es zum ersten Mal zumindest in einem *Chlamydomonas* Stamm ein nicht-selektierbares Membranprotein zu deletieren. Zudem konnten in diesem System die Funktionalität und Spezifität der *in silico* generierten ZFNs *in vivo* evaluiert werden. Dabei zeigte sich, dass nur eine der nach der „Modular-Assembly“-Methode generierten ZFNs funktional war. Durch Optimierung der FokI-Nukleaseaktivität gelang es, die Effizienz der Nuklease um ein Vielfaches zu verbessern. Sie stellt daher einen entscheidenden Schritt auf dem Weg für die Anwendung in *Chlamydomonas* dar. Die neu generierte FokI-SR/KE Mutante zeigte eine bessere Effizienz in *Chlamydomonas* als alle bisher bekannten Mutanten der FokI-Domäne. Die intrazelluläre Aktivität der Zinkfinger-Nukleasen konnte anhand der Reparatur des defekten *aphVIII* Markers überprüft werden. Da der Marker dieselbe Sequenz wie das Zielgen beinhaltet, konnte davon ausgegangen werden, dass zu einem gewissen Prozentsatz auch DNA-Doppelstrangbrüche im *COP3*-Zielgen verursacht wurden. Die Schwierigkeit zu Beginn der Experimente lag in der Unvorhersehbarkeit der Häufigkeit eines solchen Doppelvorganges. Im Laufe der Experimente zeigte sich, dass unabhängig vom DNA-Reparaturmechanismus in etwa 1% der Zellen, in denen die Zielsequenz im Selektionsmarker geschnitten wurde, auch eine Modifikation im Zielgen selbst detektiert werden konnte.

Die generierten *COP3*-Deletionsstämme zeigten auch nach mehreren Monaten alle ein stabiles Wachstum. Dies lässt darauf schließen, dass die transiente Expression der ZFNs keine zytotoxischen Effekte verursacht hat. Eine kontinuierliche Expression der ZFNs, welche nie vollkommen spezifisch sind (Wolfe et al., 2000), hätte eine Instabilität des Genoms verursachen können. Um dieses Risiko zu minimieren, wurde der Hitzeschock-induzierbare Promotor HSP70A (Schroda et al., 2000) für die Expression der ZFNs gewählt. Eine derart transiente Expression ist für die Rekombinationsinitiation ausreichend, dies konnte bereits zuvor in *D. melanogaster* gezeigt

werden (Bibikova et al., 2002). Von NHEJ und HR, den beiden Mechanismen für die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen, wird angenommen, dass sie in einem Gleichgewichtszustand arbeiten. NHEJ ist der Hauptmechanismus der DNA-Reparatur und auch während der Replikation aktiv. In eukaryotischen Zellen ist die Aktivität der HR während der späten S-Phase und G<sub>2</sub> um ein Vielfaches erhöht, die Aktivität von NHEJ bleibt hingegen konstant. Mit den Versuchen der zellzyklusabhängigen Transformation des Modellstammes ZF37 gelang es zu belegen, dass dies auch in *Chlamydomonas* der Fall ist (Abbildung 18). Das gilt speziell für die ZFNs mit den Mutationen S418P und K441E innerhalb der FokI-Nukleasedomäne. Die Zunahme der homologen Rekombinationsaktivität ist sowohl von der Architektur der FokI-Nukleasedomäne als auch von der Spezifität der Zinkfinger abhängig. Der Rückgang an Pm-R Kolonien in G1 der ZFNs mit den Mutationen S418P und K441E ist der erhöhten FokI-Aktivität geschuldet, welche in Verbindung mit unspezifischen Zinkfingern zu ungewollten Doppelstrangbrüchen im Genom führen und somit die Überlebensrate verringern kann. In eukaryotischen Zellen verbesserten die Mutationen S418P und K441E additiv die Enzymkinetik sowie die Stimulation von Mutationen *in vivo* (Guo et al., 2010; Perez-Pinera et al., 2012). Die Kristallstruktur der an DNA gebundenen FokI-Domäne zeigt, dass eine Aminosäuresubstitution an Position 418 von Ser zu Pro mit dem Verlust einer polaren Bindung zwischen FokI und dem DNA-Rückgrat verbunden ist. Diese Substitution führte zu einer erhöhten katalytischen Aktivität, wohingegen durch die Mutation S418R eine zusätzliche polare Bindung mit der DNA entstehen kann, was zu einer Abnahme der Nukleaseaktivität geführt hat. Infolgedessen konnten in Experimenten kaum Pm-R Kolonien generiert werden (Abbildung 18). Interessanterweise glückte unter Verwendung der Doppelmutation SR/KE die Generierung der meisten Pm-R Kolonien und dies beinahe unabhängig vom Zellzyklus. Eine mögliche Erklärung ist, dass FokI-SR/KE hier keine Doppelstrangbrüche verursacht, sondern lediglich einen der beiden Stränge schneidet. Dieses von Nickasen bekannte Verhalten stimuliert ebenfalls die HR, reduziert aber auch die mutagenen Effekte, die durch das NHEJ eines DSB entstehen können, und erhöht somit die Überlebensrate der Zellen (Ramirez et al., 2012). Die Reduktion von DSB, vor allem während der G<sub>1</sub>-Phase, in der keine homologe DNA-Matrize für die DNA-Reparatur vorliegt, könnte somit zu einer verbesserten Überlebensrate geführt haben.

Eine der gefundenen  $\Delta$ COP3 Mutanten enthielt eine 3,5 Kb Insertion im Zielgen. Diese Insertion bestand aus einer Kopie der Sequenz des verwendeten Modellsystems, genauer gesagt wurde die Sequenz 5' von der COP3 ZFN-Bindestelle innerhalb der *aphVIII*-Sequenz kopiert und eingefügt. Eine derartige Sequenzveränderung ist höchstwahrscheinlich durch interchromosomale Rekombination entstanden (Richardson et al., 1998; Richardson and Jasin, 2000). Auch wenn die 24 bp Homologie zwischen COP3 und der Zielsequenz im Modellsystem sehr



gering war, reichte es offensichtlich für die Initiation der HR zweier heterologer Chromosomen. Wie kürzlich zwei voneinander unabhängige Studien belegt haben, (Francia et al., 2012; Wei et al., 2012), spielen kleine nicht-codierende RNA-Moleküle (ncRNA) mit einer Länge von 21 Nukleotiden eine wichtige aber bisher nur ansatzweise geklärte Rolle in der DNA-Reparaturmaschinerie. Es konnte bewiesen werden, dass nach der Entstehung eines DSBs, 5' und 3' der Läsion RNA transkribiert wird (Abbildung 47) und diese nach weiteren Prozessionschritten der Rekrutierung von DNA-Reparaturproteinen dient. Möglicherweise genügt durch diesen Mechanismus die kurze Homologie dazu aus, eine homologe Rekombination zu ermöglichen.

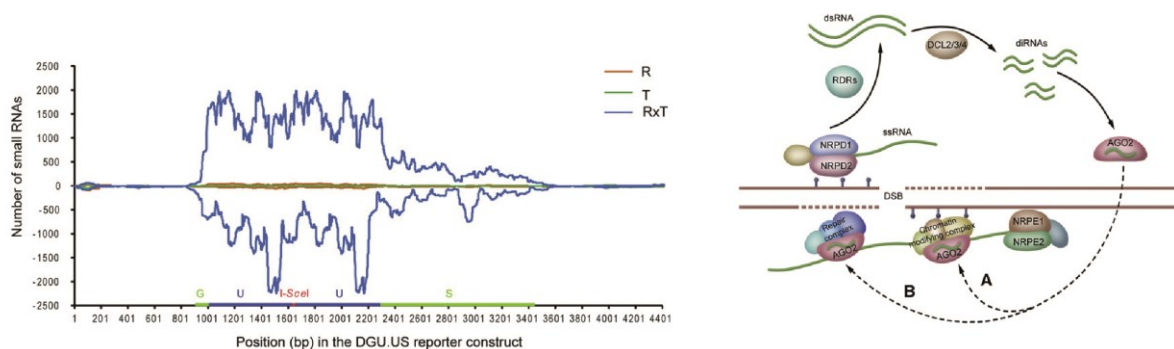


Abbildung 47 DSB induced small RNAs

(links) Experimente in *A. thaliana* zur Untersuchung der Rolle von kleinen nicht-codierenden RNAs bei der DNA-Reparatur. In der Reportersequenz DGU.US wird eine DSB verursacht (I-SceI Nuklease) und daraufhin mittels RNA-Seq die Entstehung kleiner nicht-codierender RNAs (ncRNA) bestimmt. (rechts) Modell zur Rolle der ncRNAs bei der DNA-Reparatur. Beide Abbildungen aus: (Mason, 2012)

Der Vorteil der HR gegenüber dem NHEJ ist, dass vorhersagbare Modifikationen innerhalb einer Zielsequenz möglich sind, wie anhand der Insertion von 58 bp (Klone H2 + H4) und der Deletion von 227 bp (6E und 7G) dargelegt wurde. Beides mal handelte es sich um exakte Kopien der Donor-DNA, hergestellt durch einen Mechanismus, der als „synthesis-dependent strand annealing“ beschrieben wurde (Bartsch et al., 2000; Carroll, 2011).

Auch wenn die ZFN-Zielsequenz innerhalb von *COP3* relativ weit am 3' Ende der Sequenz lag, wurde in den gefundenen Deletionsstämmen kein funktionales Protein mehr detektiert. Eine mögliche Erklärung ist die Degradation der pre-mRNA aufgrund des vorzeitigen Stopcodons und des daraus resultierenden verlängerten 3' Terminators, eine Weitere besteht im Abbau auf Proteinebene. Die Funktion des C-Terminus von Kanalrhodopsin-1 ist bisher noch nicht bekannt, es besteht jedoch die Möglichkeit, dass er für den Transport von ChR1 entlang der Rootlets zum

Augenfleck (Mittelmeier et al., 2011) mitverantwortlich ist und bei Dysfunktion ein gestörter Transport zur Degradation des Proteins führt.

## 4.2 Arbeiten am Modellsystem

Nach der erfolgreichen Anwendung der ZFNs gegen das *COP3*-Gen in Stamm CW15-302, sollten weitere Nukleasen in diesem Stamm zum Einsatz kommen. Dafür wurde die Zif268-Zielsequenz durch eine *COP5*-Zielsequenz ersetzt. Zu diesem Zeitpunkt der Arbeiten wurden TALENs für die gezielte Genstilllegung erstmals publiziert (Christian et al., 2010) und in Zusammenarbeit mit dem Labor von Prof. Feng Zhang vier TALENs für die Deletion von *COP5* hergestellt. In parallelen Arbeiten mit p60 an motilen Stämmen erwies sich die bisher verwendete Modellkassette für die Herstellung von motilen Modellstämmen als ungeeignet. Daher war vor dem Versuchsstart mit *COP5* zunächst eine Optimierung der Modellkassette erforderlich.

Ein erster Ansatz für eine verbesserte Version des Modellsystems war die Erhaltung des Leserasters. Es ist bekannt, dass sich Stamm CW15-302 in besonderer Weise für die Expression von transgenen Sequenzen eignet (Neupert et al., 2009). Das in p60 durch Insertion der Zielsequenzen entstandene frühzeitige Stopcodon kann zur Degradation der mRNA durch den Mechanismus des „*nonsense-mediated decay* - NMD“ führen (Maquat, 2004). Der NMD dient dem Abbau fehlerhafter Transkripte und der Vermeidung der Herstellung nicht-funktionaler Proteine. Der gelungene Einsatz von p60 in CW15-302 könnte an der hohen Transkriptionsrate von transgenen Sequenzen in diesem Stamm liegen. Die Western-Blot-Analyse des Fusionsproteins aus Teststamm ZF37 (Abbildung 16 B) zeigte ebenfalls ein hohes Expressionslevel. Probleme im Transfer des Modellsystems auf andere Stämme könnten daher auf die geringere Transkriptmenge sowie einen durch NMD verursachten mRNA-Abbau zurückzuführen sein. Um Letzteres zu umgehen, wurde in einer neu generierten Modellkassette das korrekte Leseraster eingehalten, um die Entstehung des vorzeitigen Stopcodons zu vermeiden. Die Inaktivierung des *aphVIII*-Markers in p70 erfolgte mittels Punktmutation. Die Zielsequenz wurde zwischen *c<sub>ycp</sub>* und *aphVIII* versetzt, damit konnte nun eine Template-DNA verwendet werden, die ohne eine Homologie zur Terminatorsequenz auskam (Abbildung 22 B). Die so erstellte Modellkassette wurde zuerst in dem motilen Stamm CC-503 getestet. Der Erhalt des Leserasters führte zu einer vereinfachten Selektion von Modellstämmen, eine Fluoreszenz des verwendeten YFPs konnte jedoch immer noch nicht erkannt werden. Die Mutation K45A im APHVIII führt zu dessen vollständiger Inaktivierung (Wright and Thompson, 1999; Nurizzo et al., 2003).

Wie eine Analyse der generierten Modellstämme zeigte, ergab sich hier das Problem zu vieler falsch-positiver Transformanten, die durch Reparatur der Mutation ohne Zugabe von Nukleasen entstanden sind. Da die Verwendung des Modellsystems auf dem Nachweis funktionaler Nukleasen und deren Notwendigkeit für die Markerreparatur beruht, musste die Strategie einer Verwendung von Punktmutationen verworfen werden. Spätere Versuche mit p80 im CC-503 Hintergrund zeigten ebenfalls eine hohe Anzahl an Kolonien in der Negativkontrolle, daher scheint dieser Stamm für die Herstellung neuer Modellstämmen nicht geeignet zu sein.

Sowohl in HEK293-Zellkultursystemen als auch in *A. thaliana* (Endo et al., 2006; Kuhar et al., 2014) wurden ebenfalls Reportersysteme verwendet, um die Aktivität von Nukleasen zu testen und DNA-Reparaturmechanismen zu untersuchen. Das in Abbildung 48 A gezeigte Reportersystem aus HEK293-Zellen verwendet zur Analyse der DNA-Reparaturmechanismen eine Nuklease-Zielsequenz innerhalb eines Fluoreszenzmarkers. Wird durch Zugabe der Nukleasen und einer Donor-DNA das GFP repariert, kann dies anhand der grünen Fluoreszenz festgestellt werden. Die 3' liegende mCherry-Sequenz beinhaltet ein zusätzliches Nukleotid, welches eine Änderung des Leserasters bewirkt. Wird der DSB durch NHEJ repariert, kann dabei eine Änderung des Leserasters erfolgen. Kommt es zu einer 2 bp InDel-Mutation, entsteht kein funktionales GFP, jedoch wird nun das Leseraster von mCherry wiederhergestellt, was anhand einer roten Fluoreszenz detektierbar ist. Die Bedeutung der Experimente für die Arbeiten in *Chlamydomonas* liegt in der Verwendung einer T2A-Sequenz für die Trennung der beiden Fluoreszenzmarker. Diese ermöglichte die physische Abtrennung eines der falsch translatierten bzw. gefalteten Fluoreszenzmarker und verhinderte einen proteolytischen Abbau des funktionalen Markers zusammen mit der falsch gefalteten Sequenz.

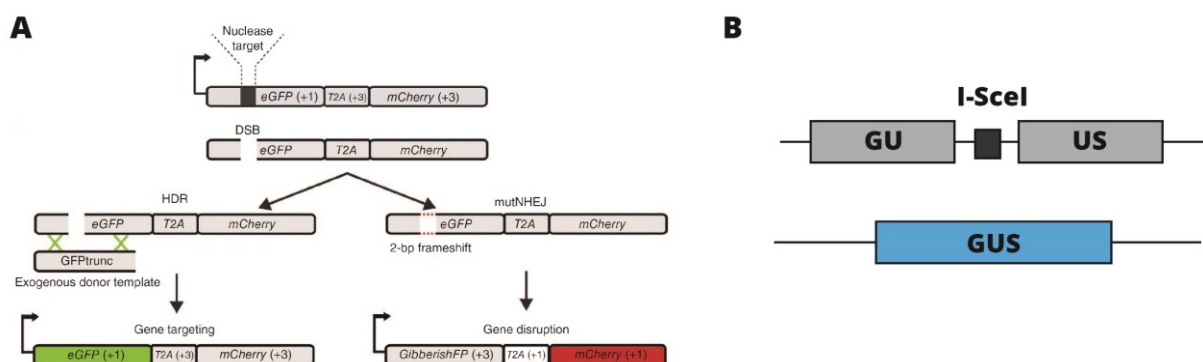


Abbildung 48 Reportersystem

Erläuterungen im Text: (A) "Traffic Light" – Reportersystem (Certo et al., 2011). (B) GU-US Reportersystem nach: (Orel et al., 2003)

Um dieses Prinzip der 2A-Peptid abhängigen Trennung von Peptiden in einem Fusionsprotein zu testen, wurde eine P2A-Sequenz zwischen *crfp* und *aphVIII* gesetzt. Ein bereits sehr lange verwendetes System zur Untersuchung von DNA-Reparaturmechanismen in Pflanzen, ist das GU-US Reportersystem (Orel et al., 2003). Bei dem in Abbildung 48 B gezeigten Beispiel wurde eine GUS-Reportergen-Sequenz durch eine Erkennungsstelle der I-SceI-Endonuklease unterbrochen. Für eine Reparatur ohne Zugabe von Template-DNA, wurden überlappende Sequenzen generiert, welche durch homologe Rekombination ein funktionales Reportergen erzeugen können. Für die Versuche wurde eine „GU-US“-Pflanzenlinie mit einer „I-SceI“-Zelllinie gekreuzt. Durch I-SceI induzierte DSB in der GU-US-Sequenz kommt es zu einer Stimulation der HR der überlappenden Enden. Analog zu diesem Prinzip wurde in *Chlamydomonas* die Reparatur einer AP-PH-Sequenz durch Stimulation der HR mittels der COP3-ZFNs getestet. Das Leseraster bleibt hierbei erhalten, da kein funktionales APHVIII entsteht. Dieser Ansatz hat zwei Vorteile gegenüber den bisher verwendeten Modellkassetten p60 und p70 (Abbildung 22). Da die Verwendung von Punktmutationen nicht realisierbar war, kann mit diesem Ansatz das APHVIII inaktiviert werden ohne das Leseraster zu ändern und möglicherweise ein vorzeitiges Stopcodon zu generieren. Dies birgt auch die Möglichkeit, den Marker mittels HR ohne die Zugabe von Donor-DNA zu reparieren. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die AP-PH-Sequenz durch fehlerhafte Proteinfaltung frühzeitig proteolytisch abgebaut wird. Daher wurde in p71 (Abbildung 23) die zuvor beschriebene P2A-Sequenz verwendet werden. Es konnte auch mit diesem Ansatz weder mit p71 noch mit p72 (COP5-Zielsequenz anstatt P2A) (Abbildung 23) ein funktionierender Modellstamm generiert werden. Eine mögliche Erklärung könnte eine zu geringe Expression der Fusionskonstrukte sein. Die Anzahl der erhaltenen Kolonien nach Transformation mit p71 oder p72 war deutlich geringer als zuvor mit p70. Dies spricht erneut für ein Problem auf Ebene der Proteinexpression. Das zu einem späteren Zeitpunkt codon-optimierte *crble* könnte möglicherweise eine signifikante Verbesserung dieses Ansatzes bedeuten. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit liegt in der Dysfunktion von Mus81, welche zu einem späteren Zeitpunkt in Stamm CW15-302 detektiert wurde (Kapitel 3.4). Wie in der Einleitung beschrieben (Kapitel 1.2.2.1.3) ist MUS81 eine Endonuklease, die die Auflösung von speziellen Holliday-Struktur-Intermediaten katalysiert. Infolgedessen könnte die in diesem Reportersystem erzeugte Holliday-Struktur ein Substrat der MUS81-Endonuklease sein. Parallel-Versuche mit p71 und p72 in CC-503 waren wenig erfolgreich, was dann doch für die Instabilität des „unterbrochenen“ Fusionsproteins als Ursache spricht.

Im weiteren Verlauf der Optimierung der Modellkassette konnte festgestellt werden, dass die verwendete *crfp*-Sequenz Probleme bei der Expression des Fusionsproteins bereitete (Abbildung

---

24). Ein Austausch des *c<sub>gfp</sub>* durch *c<sub>yfp</sub>* führte zu einer ersten Verbesserung in der Expression des Fusionsproteins. Aufgrund des verbesserten Expressionsverhaltens durch das optimierte *c<sub>yfp</sub>*, folgte im nächsten Schritt die Optimierung der verwendeten *<sup>sh</sup>ble* und *aphVIII*-Sequenzen (Dr. Irina Sizova). Zunächst wurden drei seltene Codons erfolgreich am 5´Ende der *<sup>sh</sup>ble*-Sequenz durch ortsgerichtete Mutagenese ersetzt. Die Codon-Optimierung der gesamten *aphVIII*-Sequenz war allerdings ein Kompromiss, da ein zu hoher GC-Gehalt eine Synthese unmöglich gemacht hätte.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die vorgenommenen Verbesserungen der Modellkassette die Selektion von Stämmen wesentlich vereinfacht. Die Plasmide p80 und p81 generierten beide eine ausreichende Anzahl an Modellstämmen mit vollständig integrierter Modellkassette. Allerdings gelang auch damit keine Stimulation der homologen Rekombination in motilen Stämmen, vermutlich aufgrund des codon-optimierten *c<sub>aphVIII</sub>*. Studien am Rad51-Nukleoproteinfilament zur Erkennung homologer Sequenzen und der Katalyse des Strangaustausches zeigten eine invers proportionale Abnahme dieser Mechanismen mit steigendem GC-Gehalt (Gupta et al., 1999b; Gupta et al., 1999a). Im Falle des Modellsystems könnte speziell die Fähigkeit der Homologiesuche ein entscheidender Faktor sein. Der durch die Codon-Optimierung gestiegene GC-Gehalt des *c<sub>aphVIII</sub>* ist möglicherweise die Ursache der HR-Probleme in den p80 und p81 Modellstämmen. Vor diesem Hintergrund soll im Anschluss an diese Arbeit das nicht-codon-optimierte *aphVIII* in den Plasmiden p80 und p81 getestet werden.

Die Insertion eines DSB innerhalb der Zielsequenz generiert ein Rad51-Proteinfilament, welches am Anfang keine Homologie zur Donor-DNA besitzt. In den Experimenten zur Deletion von *COP3* führte die Insertion eines Doppelstrangbruchs durch die ZFNs in einem der Klone zu einer Insertion der Modellkassette in den *COP3*-Locus (Tabelle 2). Die Homologieregion beschränkte sich dabei auf lediglich 24 bp, was ein Indiz dafür ist, wie wichtig die 5´Homologie des Rad51-Nukleoproteinfilaments zur Reparatur-Matrize sein kann. Ein möglicher Ansatz dieses Problem zu umgehen, wäre die Integration der Zielsequenz in ein Intron, welches in die *aphVIII*-Sequenz integriert werden könnte. Aus der Integration der Zielsequenz in ein Intron entstehen allerdings neue Probleme, wie die Inaktivierung des *aphVIII*. Bisherige Versuche (Dr. Julia Moldt) eines solchen Ansatzes führten noch zu keinen Ergebnissen.

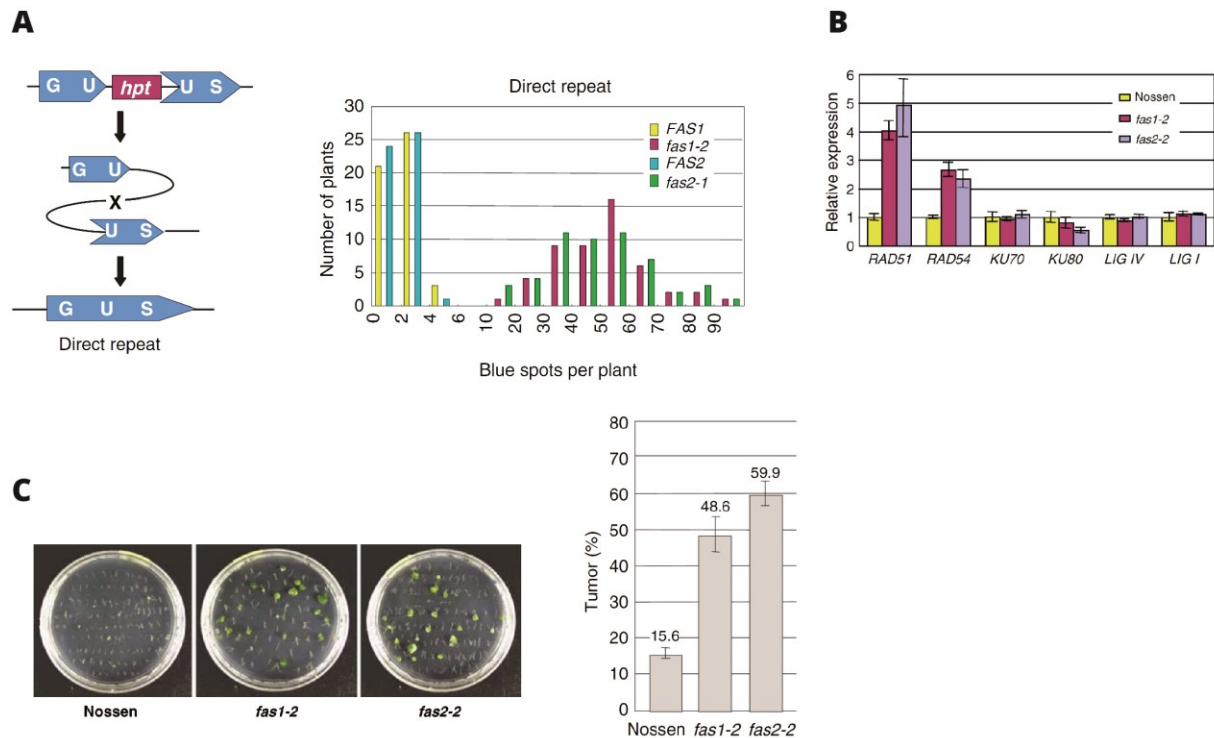


Abbildung 49 Analyse von *fas1* und *fas2* in *A. thaliana*

(A) Schematische Darstellung des Rekombinationskonstruktes. Das GUS-Reportergen kann durch Rekombination der überlappenden Sequenzen (dargestellt durch ein doppeltes „U“) wiederhergestellt werden. Rechts: Vergleich der Rekombinationseffizienz des in vorgestellten Testsystems. Die Auswertung erfolgte durch Auszählung GUS-positiver Punkte je Pflanze. Vergleich von FAS1 (gelb)- und FAS2 (blau)-Wildtypstämmen und den korrespondierenden Deletionsmutanten *fas1-2* (lila) und *fas2-1* (grün). Hierbei zeigen die Deletionsmutanten eine um das Vielfache erhöhte Rekombinationseffizienz. (B) qRT-PCR Analyse der Transkriptmengen von *rad51*, *rad54*, *ku70*, *ku80*, *Lig IV* und *Lig I*. Vergleich der Transkriptmengen im Wildtyp (Nossen; gelb) sowie *fas1-2* und *fas2-2*. (C) Wurzeltumor-Assay. Induktion von Wurzeltumoren durch nicht-homologe Integration der T-DNA nach Infektion mit *Agrobacterium tumefaciens*. Nossen ist der Wildtypstamm, in welchem die *fas1-2* und *fas2-2* Deletionsstämmen generiert wurden. Die Deletionsstämmen zeigen eine deutlich höhere Anzahl an Wurzelumoren. Rechts: Statistische Auswertung der Ergebnisse. Die Deletionsmutanten zeigen eine erhöhte Integration an T-DNA gemessen an der Anzahl von Wurzelumoren. Verändert aus: (Endo et al., 2006).

Ein weiteres Kriterium könnte die durch Sequenzierung des Stammes CW15-302 entdeckte Mutation der CAF1-A Untereinheit des heterotrimeren CAF-1 Komplexes darstellen (Kapitel 3.4). Ergebnisse einer von Endo et al. (Endo et al., 2006) durchgeführten Studie in *A. thaliana* zur Klärung des Einflusses von CAF-1 auf die homologe Rekombination, zeigen deutliche Parallelen zu den in CW15-302 beobachteten Phänotypen.

Die Untereinheiten des CAF-1 Komplexes aus *A. thaliana* sind FAS1, FAS2 und MSI3 (Kapitel 1.2.1). In der von Endo et al. durchgeführten Untersuchung der homologen Rekombination in somatischen Zellen wurde das in Abbildung 48 vorgestellte GU-US Reportersystem verwendet. Die homologen Sequenzen sind durch interchromosomale Rekombination in der Lage, ein funktionales GUS-Protein ( $\beta$ -Glucuronidase) zu erzeugen, welches nach Färbung die Detektion anhand blauer Punkte ermöglicht. Als Resultat kam es zu einem Anstieg der homologen Rekombinations-Frequenz um das 40-fache in *fas1* oder *fas2* Mutanten (Abbildung 49 A). Nach

Optimierung der Anwendung der Zinkfinger-Nuklease im Modellstamm ZF37, welcher in CW15-302 erzeugt wurde, gelang unter optimalen Bedingungen die Generierung von etwa 40 Kolonien pro Transformation. Dabei kam es in 1% der Klone gleichzeitig zur Reparatur des *aphVIII*-Markergens und einer homologen Integration von Template-DNA in den *COP3*-Locus. Würde man die Ergebnisse aus *A. thaliana* 1:1 auf *Chlamydomonas* übertragen, könnte man in einem Wildtypstamm pro Transformationsansatz nur eine Kolonie generieren. Multipliziert man den Faktor 40 mit der Häufigkeit des Doppelereignisses (Marker + Gen), wäre für eine Mutation in einem *Chlamydomonas*-Wildtypstamm eine Analyse von 4000 Kolonien erforderlich. Dies deckt sich in etwa mit den Analysen von Nelson et al. (Nelson and Lefebvre, 1995). Versuche durch homologe Rekombination in einem wildtypischen Stamm eine Integration von Donor-DNA in den selektierbaren *NIT8*-Locus zu integrieren zeigten, dass nur in einem von 2000 Fällen eine homologe Integration erfolgte. Um das Problem zu lösen könnte man z.B. in Gegenwart von *CAF1*-antisense RNA transformieren oder ein *CAF1* antisense-Konstrukt mit induzierbarem Promoter in einen Stamm genomisch integrieren.

Wie auch in Hefen (Ramirez-Parra and Gutierrez, 2007) zeigten *fas1* und *fas2* Mutanten aus *A. thaliana* eine erhöhte Expression von Genen, die an der homologen Rekombination beteiligt sind (Abbildung 49 B; Rad51 + Rad54), wohingegen die Transkriptmenge von Genen des NHEJ-Reparaturweges (KU70 + KU80) unverändert blieben.

CW15-302 ist aufgrund seiner hohen Transformationseffizienz ein beliebter Stamm. Die verwendete DNA wird durch NHEJ zufällig ins Genom integriert. Dieser Mechanismus wurde in *A. thaliana* ebenfalls im *fas1* und *fas2* Hintergrund untersucht. Die Behandlung von Wurzeln mit *Agrobacterium tumefaciens* führte zur Einschleusung der sogenannten „T-DNA“ in die Zellen, die die Bildung von Wurzeltumoren verursacht. Im Vergleich zum Wildtyp-Hintergrund (Nossen) gelang in *fas1* und *fas2* Mutanten (Abbildung 49 C) die Induktion von Wurzeltumoren drei- bis viermal häufiger. Die verbesserte Transformationseffizienz durch nicht-homologe Integration von DNA in CW15-302 kann daher auch in der *CAF1*-Dysfunktion begründet sein.

### 4.3 CRISPR/Cas9

Die Arbeiten am CRISPR-System begannen mit der Suche nach einem funktionalen U6-Promotor für die Transkription der gRNA mittels RNA-Polymerase III. Es konnten mehrere U6 snRNA-Sequenzen in der Genomdatenbank gefunden werden. Wie sich nach Analyse der Sequenzen ergab, war das in vielen anderen Organismen konservierte PSE-Element hier nicht vorhanden. Parallel zur Analyse der gefundenen U6-Promotorsequenzen wurden auch die in Weizen und Reis (Jiang et al., 2013) verwendeten U6-Promotoren getestet. Abgesehen von den gemessenen unterschiedlichen Transkriptmengen konnte durch diese Experimente gezeigt werden, dass eine Expression der gRNA in *Chlamydomonas* durch Verwendung verschiedener U6-Promotoren möglich ist. Dies belegen auch die mit U6-Weizen erfolgreich durchgeführten Experimente im ZF37-Modellstamm (Abbildung 35 C).

Unabhängig von der Transkriptmenge ist auch die Transkriptlänge ein Faktor, der die Effizienz einer gRNA beeinflussen kann. In den Versuchen mit U6-Promotoren aus *C. reinhardtii* wurden die RNAP III Terminator-Sequenzen (5' AAATTTTTT 3') übernommen, um eine exakte Transkriptlänge zu ermöglichen, was jedoch nicht experimentell verifiziert werden kann. Daher gibt es zwei unsichere Faktoren, die eine Verwendung der U6-Promotoren mit sich bringt. Zum einen kann die richtige Transkriptmenge nicht definiert werden, so dass die Gefahr ungewollter „off-target“-Effekte durch ein zu hohes Transkriptlevel bzw. die Verhinderung einer Mutation durch ein zu niedriges Transkriptlevel besteht. Der zweite unbeständige Faktor ist die nicht exakt definierte Länge der gRNA.

Um diese beiden Unwägbarkeiten auszuschließen, wurden in einem weiteren Ansatz *in vitro* transkribierte gRNA hergestellt. Die Anwendung von RNA für Transformationen hat mehrere Vorteile:

1. Die experimentell verwendete Menge an gRNA-Transkripten kann variiert und optimiert sowie die Versuchsbedingungen exakt repliziert werden.
2. Die Länge der gRNA ist genau definiert, da für die Amplifikation durch die T7-RNA Polymerase ein definiertes PCR-Produkt verwendet wurde.
3. Cytotoxische-Effekte können durch die transiente Verfügbarkeit der Transkripte innerhalb der Zellen reduziert werden.



Erste Versuche mit *in vitro* hergestellter RNA führten zu positiven Ergebnissen bei der Anwendung im Teststamm ZF37 (Abbildung 36) und einer deutlich höheren Anzahl an Klonen als in der Negativkontrolle. Eine weitere Optimierung der Versuchsbedingungen kann daher möglicherweise ein wichtiger Schritt für die Anwendung von Cas9 in *Chlamydomonas* sein. In einer ersten veröffentlichten Studie über das CRISPR/Cas9-System in *Chlamydomonas* wurde versucht, eine Deletion des *FKB12*-Gens zu generieren (Jiang et al., 2014). Die Deletion von *FKB12* ermöglicht eine Selektion von Einzelkolonien auf Rapamycin. Obwohl in dieser Studie nur ein Klon eine Rapamycin-Resistenz aufwies, könnte dieser Ansatz für die Optimierung der Applikation von *in vitro* synthetisierter gRNA herangezogen werden.

### **PAM und Protospacer**

Erste Studien an Cas9 für die Deletion von Zielgenen beschrieben auch die notwendigen Sequenzmotive des Protospacers und der PAM (*protospacer adjacent motif*)-Sequenz (Cong et al., 2013; Mali et al., 2013). Restriktionen einer Zielsequenz beschränken sich auf die Basenpaarabfolge 5´G-[N19]-NGG 3´. Die Transkriptionsinitiation durch die T7-RNAP (*in vitro*) oder RNAP-III (*in vivo*) erfordert hierbei einen Beginn des Protospacer mit Guanin. Das im Anschluss an den Protospacer folgende PAM muss die Form „NGG“ haben, wobei „N“ ein beliebiges Nukleotid sein kann.

Wie auch für ZFNs und TALENs, spielt die Spezifität der verwendeten Nukleasen eine wichtige Rolle. Schon bald konnte gezeigt werden, dass für die Induzierung eines DNA-Doppelstrangbruchs keine hundertprozentige Homologie des Protospacers zur Zielsequenz nötig ist (Hsu et al., 2013; Cho et al., 2014). Die Toleranz fehlerhafter Basenpaarungen nimmt hierbei, ausgehend von der PAM, in 5´Richtung zu (Abbildung 50 A).

Cas9-Nickasen sollten daher die „off-target“-Aktivität reduzieren, ähnlich der Anwendung von heterodimeren FokI-Nukleasedomänen in ZFNs (Ran et al., 2013). In der von Ran et al. durchgeführten Studie konnte gezeigt werden, dass eine „Head to head“-Konfiguration, also ein Gegenüberliegen der 5´Enden der Protospacer optimal ist, wenn diese eine Distanz von ~ 20 bp aufweisen. Auf Grundlage dieser Erkenntnisse erfolgte die Erstellung der in dieser Arbeit verwendeten gRNA-Sequenzen sowie die Durchführung der Experimente zur Deletion von *PHOT* (PT1 und PT2) bei der Wahl geeigneter Protospacer. Zum damaligen Zeitpunkt waren Kriterien für die Auswahl möglichst „spezifischer“ Protospacer gegeben, es fehlten jedoch experimentelle

Daten, die die Kriterien einer besonders „aktiven“ bzw. „funktionalen“ gRNA-Sequenz beschrieben.

Erst nach Beendigung der Laborarbeiten wurde eine Studie über die Charakteristika der Protospacer- und PAM-Sequenzen publiziert (Doench et al., 2014). In diesen Arbeiten wurden die codierenden Sequenzen verschiedener zellulärer Oberflächenmarker aus humanen Krebszelllinien als Zielsequenzen verwendet. Insgesamt konnten in den Exons dieser Markergene 1841 gRNA Erkennungsstellen gefunden werden, für die daraufhin eine gRNA-Bibliothek erstellt wurde. Für die Analyse der in Verbindung mit Cas9 aktivsten gRNAs aus diesem Pool wurden biallelische Knockout-Zellen durch fluoreszenzabhängige Zellsortierung in einem Durchflusszytometer isoliert. Daraufhin konnten die gRNA-Sequenzen dieser Zellen analysiert und die Charakteristika bioinformatisch aufgearbeitet werden. Die Abbildung 50 B zeigt das Ergebnis dieser qualitativen Sequenzanalysen (Doench et al., 2014). Die Auswertung der gefundenen PAM-Sequenzen in diesen besonders aktiven gRNAs zeigt hierbei eine Präferenz für Cytosin an der Position des variablen Nukleotid „N“, wohingegen Thymin die Aktivität senkt. Unmittelbar vor dem PAM führt die Verwendung eines Guanins zu den besten Ergebnissen, Cytosin hingegen bewirkt eine Verschlechterung der gRNA Funktion. Allgemein ist die Anordnung der letzten zehn Basenpaare des Protospacers, die sogenannte „seed-region“, entscheidend für die Spezifität des Protospacers und die Erkennung der Zielsequenz (Doench et al., 2014). Innerhalb der seed-region sind Adenin und Cytosin von Vorteil und der Verwendung von Guanin und Thymin vorzuziehen. Die aus diesen Experimenten erhaltenen Daten wurden für die Erstellung eines Algorithmus verwendet, der online zugänglich ist, um möglichst funktionale gRNA für eine zugrunde gelegte Zielsequenz zu finden (<http://www.broadinstitute.org/rnai/public/analysis-tools/sgrna-design>). Die dabei erhaltenen „sgRNA-Scores“ geben die theoretische gRNA-Aktivität mit Werten von 0,1 – 1 an, wobei 1 der beste Wert ist.

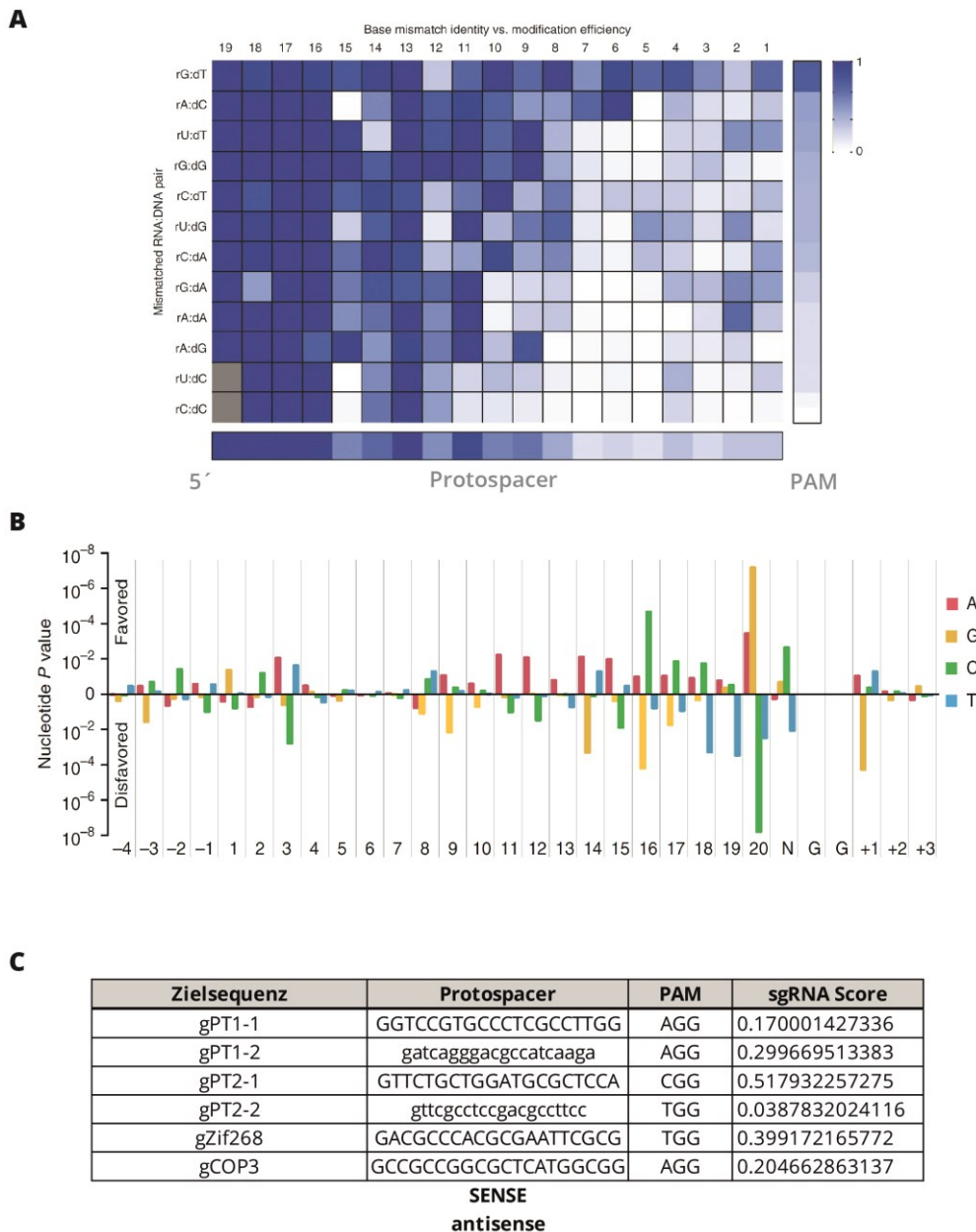


Abbildung 50 Analyse der verwendeten gRNA

(A) Intensitätskarte der relativen Cas9-Spezifität. Analyse möglicher RNA:DNA-Fehlpaarungen (Y-Achse) und die daraus resultierende Änderung der Häufigkeit generierter DNA-Doppelstrangbrüche. Farbcodierung von wenig toleriert (weiss) bis toleriert (blau). Verändert nach: (Hsu et al., 2013) (B) Modell der sgRNA Aktivität. Aus: (Doench et al., 2014). Sequenzanalyse der aktivsten gRNAs, den Nukleotiden 5' und 3' des Protospacers und der PAM. (C) Analyse der sgRNA-Scores der in dieser Arbeit verwendeten Protospacer-Sequenzen. Protospacer, die den Antisense-Strang binden, sind in Kleinbuchstaben gezeigt. Protospacer mit dem Sense-Strang als Ziel sind in Großbuchstaben angegeben.

Während der experimentellen Arbeiten mit dem Cas9-System stand noch kein Evaluationsprogramm für die Auswahl der Protospacer-Sequenzen zur Verfügung. Daher wurde nun das „sgRNA-Designer“-Programm benutzt, um die Qualität der verwendeten gRNAs im Nachhinein zu analysieren. Die erhaltenen „sgRNA Scores“ geben dabei an, wie hoch die Wahrscheinlichkeit einer aktiven sgRNA ist. Ab einem Wert von 0,6 beträgt die Wahrscheinlichkeit einer aktiven sgRNA 66% (Doench et al., 2014). Die Werte der vier für die Phototropin-Deletion

erstellten gRNAs liegen hierbei zwischen 0,03 und 0,51. Damit sind sie unter dem wünschenswerten Schwellenwert von 0,6. Die für die Anwendung im Modellsystem generierten gZif268 und gCOP3 liegen mit 0,39 und 0,2 ebenfalls unter dem empfohlenen Wert (Abbildung 50 C). Da die Zielsequenz für Zif268 / COP3 lediglich 50 bp lang ist, konnten auch mit dem verfügbaren „sgRNA Designer“-Programm keine besseren gRNAs für diesen Sequenzabschnitt gefunden werden.

### Cas9

Für die Expression von <sup>Sp</sup>Cas9 in *C. reinhardtii* erfolgte eine Codon-Optimierung der codierenden DNA-Sequenz. Schon zu Beginn der Arbeiten bestand die Vermutung, dass die Expression eines heterologen Proteins dieser Größe (165 kDa) in *C. reinhardtii* Probleme bereiten könnte. In verschiedenen Ansätzen wurde daher versucht, eine konstitutive Expression von Cas9 zu ermöglichen. Die C-terminale Fusion an das im Modellsystem verwendete BLE:YFP:P2A-Protein ermöglichte die Vorselektion fluoreszierender Klone. Eine Detektion des N-terminal an Cas9 fusionierten 3xFLAG-Markerpeptids war jedoch nicht möglich, auch aufgrund des für *C. reinhardtii* ungeeigneten Anti-FLAG-Antikörpers. Es war zwar bekannt, dass ein HA-Markerpeptid in *Chlamydomonas* bessere Ergebnisse ermöglicht als das FLAG-Markerpeptid, jedoch hätte dies eine Änderung der publizierten Cas9-Aminosäuresequenz (Cong et al., 2013) bedeutet. Um eine Funktionalität des Cas9-Konstruktes zu gewährleisten, erfolgte zu Beginn der Arbeiten kein Austausch des N-terminalen Markerpeptides.

Das zuerst verwendete <sup>Sh</sup>ble:<sub>C</sub>yfp:p2a:<sub>C</sub>Cas9-Konstrukt wurde in Stamm CC-3403 getestet. Es zeigte sich aber in den Kontrollen, dass bereits nach kurzer Zeit ein epigenetisches Silencing des BLE:YFP in Stamm CC-3403 stattfand (Abbildung 30 A), was eine Analyse der Experimente unmöglich machte. Stamm CW15-302 wäre für diese Experimente vielleicht die bessere Wahl gewesen, da dieser keine Silencing-Effekte zeigt. Aufgrund von Kontaminationen in der *Chlamydomonas*-Stammkultur konnte zu diesem Zeitpunkt jedoch leider nicht auf CW15-302 zurückgegriffen werden. Die Ergebnisse dieses Ansatzes in Stamm CW-3403 sind ein schönes Beispiel für die rasche epigenetische Reduktion der Transkription von transgenen Sequenzen in *C. reinhardtii*. Die experimentelle Konzeption ist für eine Analyse der Cas9-Funktion sehr interessant und soll in nachgelagerten, leicht modifizierten Experimenten in Stamm CW15-302 wiederholt werden. Analog zu den Versuchen der Fusion des verbesserten <sub>C</sub>ble-Markers mit Cas9 (Abbildung 30 B)

soll dann auch ein  $_{cr}BLE:YFP:P2A:Cas9$ - und  $_{cr}BLE:YFP:SPACER:Cas9$ -Fusionsprotein exprimiert werden.

Im Rahmen der Optimierung des Modellsystems erfolgte eine Codon-Optimierung des  $^{sh}ble$ -Markers (Dr. Sizova). Die damit einhergehende verbesserte Expression von Fusionsproteinen sollte auch an Cas9 getestet werden. Mit dieser Strategie konnten Klone im CW15-302 Hintergrund generiert werden, welche in den Analysen ein Fusionprotein der richtigen molekularen Größe exprimierten. In den von Jiang et al. durchgeführten Arbeiten zu Cas9 in *Chlamydomonas* wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine Expression von Cas9 toxische Effekte für die Zellen hat, auch ohne die Zugabe einer gRNA. Die hier durchgeführten Arbeiten stehen folglich im Widerspruch zu dieser Hypothese.

In nachgelagerten Versuchen soll nun ein funktionaler Assay durchgeführt werden, welcher die Deletion des *FKB12*-Genes zum Ziel hat. Es konnten bereits zwei gRNAs mit einem gRNA-Wert von 0,8 innerhalb der *FKB12*-Sequenz gefunden werden. Versuche mit U6-Promotoren als auch mit *in vitro* hergestellten gRNAs mit den BLE:Cas9 Überexpressionsstämmen sollen nun klären, ob durch Deletion von *FKB12* eine Rapamycin-Resistenz erzeugt werden kann (Jiang et al., 2014).

Für Versuche der Kernlokalisierung von Cas9 in *C. reinhardtii* wurde ein CAS:YFP-Fusionsprotein in Stamm CC-1618 exprimiert. Dabei wurde, wie auch bei allen anderen hier beschriebenen Cas9-Konstrukten, ein Kernlokalisierungssignal (NLS) an das Cas9:YFP-Fusionsprotein N- und C-terminal angefügt (Cong et al., 2013). Experimentell konnte in den Arbeiten von Cong et. al gezeigt werden, dass die Verwendung von zwei NLS die beste Kernlokalisierung von Cas9 ermöglicht. In einigen der mikroskopisch analysierten Kolonien konnte ein schwaches Signal innerhalb des Cytosols und des Nukleus detektiert werden. Aufgrund der geringen Signalstärke gelang die Detektion der Signale nur durch Überlagerung von Einzelaufnahmen (Abbildung 31). Die Signaldetektion konnte aufgrund des Fehlens eines Cas9-spezifischen Antikörpers biochemisch nicht verifiziert werden. Seit kurzem sind auch Cas9-spezifische Antiseren kommerziell erhältlich, welche in weiteren Arbeiten getestet werden sollen.

In unveröffentlichten Ergebnissen der Arbeitsgruppe von Prof. Feng Zhang (Broad Institute, MIT) konnte zudem belegt werden, dass in Anwesenheit einer gRNA eine erhöhte Akkumulation von Cas9 im Kern generiert werden kann. Die Hintergründe dieser Ergebnisse sind schwer interpretierbar, denn eigentlich sollte die gRNA den Kern nicht verlassen. Es könnte jedoch durch Diffusion der gRNA aus dem Kern eine mögliche Bindung an Cas9 im Cytosol stattfinden. Alternativ wäre es auch denkbar, dass der Abbau der Zellkernmembran während der Mitose eine

---

Interaktion von Cas9 mit der gRNA ermöglicht und dies nach Wiederaufbau der Zellkernmembran zu einer verbesserten Akkumulation von Cas9 im Zellkern führt. Grundlage beider Hypothesen ist hierbei eine strukturelle Veränderung von Cas9 nach Bindung an die gRNA, was eine verbesserte Exposition des NLS zur Folge hat. In einem BLE:CAS9-Fusionsprotein sollte dies jedoch keine Rolle spielen, da sich diese strukturellen Änderungen nicht auf das N-terminal am BLE befindliche NLS auswirken sollten.

Für eine erste Anwendung des Cas9-Systems in *Chlamydomonas* sollte eine Deletion des Phototropin-Gens getestet werden. Die hierfür hergestellten vier gRNAs hatten zwei Sequenzabschnitte (PT1 und PT2) im Exon 4 als Zielsequenz. Trotz sorgfältiger Vorversuche konnte mit dem Mismatch-Nuklease-Assay kein zufriedenstellendes Resultat erzielt werden. Es konnten zwar für PT2 Degradationsprodukte detektiert werden, die anschließende Analyse lieferte jedoch keine positiven Mutanten (Abbildung 32). Daher bleibt festzuhalten, dass diese Form der Detektion von Mutationen in *Chlamydomonas* nicht geeignet ist. Höchstwahrscheinlich entstehen nach der Rehybridierung der PCR-Produkte Fehlpaarungen der DNA-Doppelstränge, verursacht durch den hohen GC-Gehalt des *C. reinhardtii* Genoms oder repetitive Sequenzen.

Auch Versuche, eine höhere Anzahl an Kolonien durch NGS-Methoden (Next-Generation-Sequencing) zu analysieren, hatten keinen Erfolg. Die im Nachhinein möglich gewordene Analyse der verwendeten gRNAs ergab, dass keine der vier verwendeten gRNA-Sequenzen (siehe 3.3.2.3) den in diesem Algorithmus festgelegten Kriterien für eine in hohem Maße funktionale gRNA entsprach. Ein weiterer Problempunkt stellte die Analyse der NGS-Daten dar. Eine Vielzahl an Basenpaaränderungen in den Kontrollesequenzen verhinderte eine statistisch signifikante Mutationsdetektion. Ein funktionaler experimenteller Ansatz hätte zumindest in geringem Umfang zu Insertionen oder Deletionen innerhalb der Zielabschnitte führen müssen. Da diese Art der Sequenzanalyse nicht von einzelnen Basenpaaränderungen betroffen ist und keine derartigen Mutationen detektiert werden konnten, ist davon auszugehen, dass andere Faktoren wie eine nicht-funktionale gRNA eine erfolgreiche Durchführung verhinderten.

In zukünftigen Ansätzen sollten Protospacer-Sequenzen gesucht werden, die einen gRNA-Wert von mindestens 0,6 – 0,8 aufweisen. Für weitere NGS-Versuche muss zudem ein für hohen GC-Gehalt optimiertes Puffersystem bei der Durchführung der Sequenzierung verwendet werden und die Sequenzierung der Fragmente muss in sense- und antisense-Richtung erfolgen, um mögliche Fehler während des Sequenziervorgangs zu eliminieren.

Versuche der direkten Selektion von Deletionsmutanten lieferten bisher nicht das gewünschte Ergebnis. Daher sollte, ähnlich wie für die ZFNs, zuerst eine weitere Optimierung der

---

Komponenten des CRISPR/Cas9-Systems für die Anwendung in *Chlamydomonas* stattfinden. In Teststamm ZF37 erfolgte die Inaktivierung des *aphVIII*-Markers durch Insertion der Zielsequenzen für Zif268 und *COP3*. Innerhalb dieses Sequenzabschnittes konnten zwei gRNA-Zielsequenzen gefunden werden (gZif268 und g*COP3*). Eine spätere Analyse der sgRNA-Qualität ergab einen Wert von 0,39 für gZif268 und 0,2 für g*COP3*. Damit liegen diese Werte unterhalb des Grenzwertes von 0,6, so dass eine Optimierung der Zielsequenzen erforderlich ist.

Im Rahmen der Arbeiten einer optimierten Anwendung von Cas9 wurde auch die kürzlich für *A. thaliana* vorgestellte Methode der Endoreplikation von Plasmid-DNA getestet (Baltes et al., 2014). Diese als Replicons bezeichneten Plasmide beruhen auf der aus Geminiviren bekannten Replikation des einzelsträngigen Viren-Genoms in Pflanzenzellen. Dabei wird, nach Einschleusung der einzelsträngigen Geminivirus-Plasmid-DNA, die zelleigene Replikations-Maschinerie dafür benutzt, doppelsträngige DNA herzustellen. Die doppelsträngige DNA wird dann für die Transkription von Virus-Genen benutzt und das Plasmid durch eine „rolling-circle“-Amplifikation intrazellulär vermehrt. Für Experimente in *C. reinhardtii* wurde das von Baltes et al. vorgestellte Ein-Plasmid-System (pLSLR). In einem vergleichenden Experiment mit den Cas9-Expressionsvektoren p105 und pLSLR konnten deutlich mehr Kolonien mit pLSLR generiert werden als mit p105 und der Negativkontrolle (Abbildung 35 C). Eine Sequenzanalyse ergab, dass die *aphVIII*-Sequenz der mit pLSLR generierten Klone korrekt repariert wurde. Als Ergebnis kann deshalb festgehalten werden, dass dies den ersten funktionalen Ansatz des Cas9-Systems in *C. reinhardtii* darstellt.

Eine genaue Analyse der Replicon-Menge, wie sie bereits für *A. thaliana* gezeigt wurde (Baltes et al., 2014), wird aufgrund ihres zeitlichen Umfangs nachgelagert erfolgen. Ein möglicher Hinweis für eine Funktionalität in *Chlamydomonas* sind die Ergebnisse der Negativkontrollen mit pLSLR  $\Delta 120aphVIII$ . In diesen Ansätzen wurden im ZF37-System, ohne Zugabe von Nukleasen, deutlich mehr Kolonien generiert als mit dem Standard-Donor (pKS  $\Delta 120aphVIII$ ) (Abbildung 35 B+C), was für eine erhöhte Menge verfügbarer, durch Endoreplikation entstandener Donor-DNA sprechen könnte.

Die Vergleiche von pLSLR und p105 haben gezeigt, dass trotz identischer Promotor-, Cas9- und Terminatorsequenz mit p105 keine Kolonien generiert werden konnten. Grund hierfür könnten möglicherweise cytotoxische Effekte der konstitutiven Cas9-Expression durch Integration in das Genom gewesen sein. Daher sollte der auch für die ZFNs erfolgreich verwendete Hitzeschock induzierbare Promotor HSP70a (HSP) (Schroda et al., 2000) für eine transiente Expression von

Cas9 getestet werden. Die durchgeführte Versuchsreihe in Teststamm ZF37 führte zu keinem positiven Ergebnis. Eine mögliche Erklärung liegt in der Versuchsdurchführung. Die Erfahrungen mit dem Hitzeschock-Promotor beruhten auf den Experimenten zur Optimierung der ZFN-Aktivität in ZF37. Für die Expression der wesentlich kleineren ZFNs konnte der ideale Zeitpunkt für die Applikation des Hitzeschocks und der darauf folgenden Transformation auf zwei Stunden vor Beginn der Dunkelphase bestimmt werden. Diese Bedingungen wurden auch für Cas9 übernommen. Jedoch könnte für die Akkumulation einer ausreichenden Menge der wesentlich größeren Cas9-Proteine während der S-Phase, eine größere Vorlaufzeit nötig sein. Auch die im Vergleich mit den bisher verwendeten Promotoren geringere Aktivität des Hitzeschock-Promotors (Schroda et al., 2000) könnte unzureichend für die Expression von Cas9 sein. In nachgelagerten Experimenten soll mit dem endogenen Markergen *FKB12* als Zielgen, noch einmal ein vergleichender Versuchsansatz der verschiedenen Expressionsvektoren erfolgen.

Experimente mit *in vitro* hergestellter RNA von Cas9 und der gRNA wurden mit Blick auf die Versuche der konstitutiven Expression von  $\text{c}_{\text{r}}\text{BLE}:\text{Cas9}$  (Abbildung 30 C), durchgeführt. Es bestand die Vermutung, dass eine Transformation mit Plasmid codierten gRNA-Sequenzen und eine daraus resultierende konstitutive Expression zu cytotoxischen Effekten führen könnte. Daher wurde für diesen Ansatz RNA verwendet, um eine möglichst kurze Interaktion von Cas9 mit gebundener gRNA und genomischer DNA zu begünstigen. Auch die Applikation von Cas9-RNA würde den Vorteil einer transienten Expression mit sich bringen und eine mögliche Reduzierung cytotoxischer Effekte bewirken.

In einem ersten Ansatz wurde Teststamm ZF37 mit einer Mischung aus DNA und RNA für die Codierung von Cas9 und den gRNAs verwendet. Als Resultat konnten viermal mehr Kolonien generiert werden als in den Kontrollen (Abbildung 36). Die Analyse der im Zusammenspiel funktionierenden Komponenten wird im Anschluss an diese Arbeit stattfinden. Aufgrund der ausschließlichen Verwendung von gRNA-RNA in den Ansätzen, kann jedoch schon resümiert werden, dass diese in den Versuchen funktional war.

#### **Zusammenfassung der neuen experimentellen Ansätze für die Anwendung in *C. reinhardtii*:**

**pLSLR-Replicons** wurden hier zum ersten Mal für eine Versuchsdurchführung in *Chlamydomonas* getestet. Es konnte festgestellt werden, dass die Verwendung des pLSLR-Cas9 Vektors im ZF37-Testsystem erfolgreich war. Um eine weitere Verbesserung in der Anwendung zu erreichen, muss auch für die Replicon-Strategie eine Optimierung stattfinden. Die positiven Versuche mit pLSLR-Cas9 rechtfertigen eine genauere Analyse dieser Strategie für die Anwendung in *C. reinhardtii*.

---



**In vitro** transkribierte gRNA und die Transkription von Cas9 für die Expression lieferten erste positive Ergebnisse. In einem „Multiplex“-Ansatz (Abbildung 36 B) konnte mit *in vitro* hergestellter RNA eine Reparatur der Modellkassette in Stamm ZF37 erfolgen. Die Möglichkeit, eine exakt definierte gRNA-Sequenz herzustellen, die transiente Verfügbarkeit und eine definierbare Transkriptmenge für die experimentellen Ansätze sind Vorteile dieser Anwendung. Die Verwendung von RNA für das Cas9-System wurde bisher vor allem erfolgreich in Systemen wie z.B. embryonale Maus-Stammzellen verwendet, die eine Transfektion durch Mikroinjektion erlauben (Inui et al., 2014). In der von Inui et al. durchgeführten Studie wurden für die Injektion in Mausembryos *in vitro* synthetisierte Transkripte der Cas-Nuklease und der gRNA verwendet. Zusätzlich als Template für die Insertion von Punktmutationen wurden einzelsträngige Oligonukleotide erfolgreich eingesetzt.

**ssODNs** (aus dem englischen: „*single-stranded-oligodesoxynucleotides*“; einzelsträngige Oligodesoxynukleotide), die als Template-DNA verwendet werden können, haben den Vorteil, dass für die gleichzeitige Deletion mehrere Gene auf simple Weise Donor-Sequenzen synthetisch hergestellt werden können. Der Nachteil dieser meist etwa 100 bp langen Sequenzen ist die sinkende Effizienz der homologen Integration mit steigender Anzahl nicht-homologer Basen. Daher werden ssODNs zumeist für die Insertion von Punktmutationen oder der Deletion kurzer Abschnitte verwendet.

Auch in den hier durchgeführten Experimenten konnten zum ersten Mal erfolgreich ssODNs zusammen mit den COP3-ZFNs verwendet werden, um eine Deletion der ZFN-Erkennungsstelle innerhalb des *aphVIII* im Teststamm ZF37 zu erzeugen, und somit ein funktionales Markergen zu erhalten. Das Verhältnis von ssODN-Länge (100 bp) zur Länge der nicht-homologen ZFN-Zielsequenz (50 bp) war hierbei nicht ideal, führte aber trotzdem zum gewünschten Ergebnis. Für weitere Versuche mit Cas9-Zielsequenzen kann dieses Verhältnis verbessert werden, um möglicherweise eine höhere Effektivität der homologen Rekombination zu erreichen.

Es wurde gezeigt, dass die Verwendung von Cas9 in *C. reinhardtii* möglich ist. Eine weitere Optimierung der Versuchsbedingungen steht, wie für die Zinkfinger-Nukleasen, noch aus. Im Modellstamm ZF37 konnte durch Cas9 eine Reparatur des *aphVIII*-Markers stattfinden. Die dabei verwendeten gRNAs mit gRNA-Werten von 0,2 und 0,4 sind nicht optimal, funktionieren aber zumindest in geringem Umfang.

Ein Kriterium, das für die Verwendung von Cas9 in *C. reinhardtii* bedacht werden muss, ist die Verfügbarkeit von offenen Chromatinstrukturen für die Erkennung der Zielsequenz. Eine von

Kuscu et al. (Kuscu et al., 2014) durchgeführte Analyse der „off-target“-Aktivität von Cas9 zeigte eine erhöhte Affinität für Exons und Promotorregion. Diese Erkenntnis geht einher mit dem beschriebenen Mechanismus der Cas9-DNA Interaktion. Dabei erfolgt die Detektion der Zielsequenz der DNA nicht durch Absuchen entlang der Chromosomen, sondern durch zufällige Kollision mit der DNA. Im ersten Schritt werden dabei nur die PAM-Motive detektiert. Bei einer Kollision mit einer nicht-PAM-Sequenz dissoziiert Cas9 sehr schnell wieder von der DNA. Erst wenn eine korrekte PAM erkannt wird, werden die weiteren Sequenzabschnitte des Protospacers mit der DNA verglichen (Sternberg et al., 2014). Dieser Mechanismus hat für die Experimente in *Chlamydomonas* eine weitreichende Bedeutung. Die Verwendung des Modellsystems beruht auf der nicht-homologen Integration der Modellkassette in das Genom. Durch die Selektion auf Antibiotika-Resistenz werden offene Chromatinstrukturen bevorzugt, da diese eine hohe Transkriptionsaktivität erlauben. Aus diesem Grund ist die Zielsequenz innerhalb des inaktivierten Markers zwar identisch mit dem Zielgen, der chromosomale Kontext ist jedoch grundverschieden. Daher sind Ergebnisse einzelner Modellstämme, aufgrund der unterschiedlichen chromosomalen Insertionsstellen der Modellkassette, ebenso schwer zu vergleichen, wie die Effektivität der Deletion eines Zielgens durch verschiedene Nukleasen. In den Analysen der diurnalen Transkriptmenge der Photorezeptoren wurde die Variabilität der Transkriptionsaktivität der einzelnen Gene aufgezeigt. Vor allem gegen Ende der Dunkelphase findet in allen Photorezeptoren, abgesehen von *aCRY*, eine erhöhte Transkription statt (Abbildung 39). Dies wäre somit der ideale Zeitpunkt für eine Anwendung des Cas9-Systems, da eine offene Chromatinstruktur vorliegt. Für die Etablierung der homologen Rekombination mit Cas9, dies gilt vermutlich für alle Nukleasen, ergibt sich ein Paradoxon: Die homologe Rekombination ist fast ausschließlich während der S/M-Phase aktiv, in *Chlamydomonas* bedeutet dies gegen Ende der Lichtphase und zu Beginn der Dunkelphase. Vor allem in einem haploiden Organismus wie *C. reinhardtii* wäre eine Aktivität der homologen Rekombination in der G1-Phase nur wenig sinnvoll, da kein Schwesterchromatid vorhanden ist, welches als Template für die Reparatur eines DNA-Doppelstrangbruchs verwendet werden könnte. Für die Reparatur der Modellkassette ist also die S/M-Phase zwingend nötig, für die Erkennung der Photorezeptor-Zielsequenz ist hingegen die Wachstumsphase G1 ideal (siehe auch Kapitel 1.1.2).

Eine offene Chromatinstruktur ist ein wichtiger Faktor für die Realisierbarkeit der homologen Rekombination in *Chlamydomonas*, dies betrifft auch die Analyse der Genomsequenzierung des Stammes CW15-302. Da es bisher in keinem anderen Stamm gelungen ist, einen funktionalen Modellstamm zu generieren oder gar ein Gen durch homologe Rekombination zu verändern, verstärkt dies das Forschungsinteresse an der *CAF1-A* Dysfunktion in CW15-302. Auch wenn

---

genauere Analysen der Chromatinstruktur in Stamm CW15-302 noch ausstehen, so ist aus der Literatur zu entnehmen, dass eine Mutation in CAF1 zu einer teilweisen Öffnung des Heterochromatins führt (Ramirez-Parra and Gutierrez, 2007). Ebenfalls erfolgt eine erhöhte Expression von Proteinen der homologen Rekombinations-Maschinerie (Endo et al., 2006; Schönrock et al., 2006). Infolgedessen ist diese Mutation nicht nur für eine erhöhte Frequenz der homologen Rekombination förderlich, sondern erlaubt außerdem durch die Öffnung der Chromatinstruktur eine verbesserte Zielfindung der Nukleasen. Eine Möglichkeit diesen Zustand in motilen Stämmen zu generieren, wäre daher ein Knockdown von CAF1 in diesen Stämmen.

**Die hier gewonnenen Erkenntnisse sollen für zukünftige Durchführungen von Deletionsexperimenten in *Chlamydomonas* kurz zusammengefasst werden:**

1. Für Experimente mit Cas9 sollte möglichst eine AT-reiche Sequenz innerhalb des Zielgens ausgesucht werden. Die Wahl der geeigneten Protospacer kann mit dem online verfügbaren „sgRNA Designer“-Programm durchgeführt werden. Die dabei berechneten „sgRNA-Scores“ sollten mindestens einen Wert von 0,6 aufweisen.
2. In Deletionsexperimenten ist die Verwendung von mindestens zwei gRNAs zu empfehlen. Falls die Cas9-Nickase dabei getestet werden soll, müssen die 5' Enden der Protospacer gegenüberliegend gewählt werden, wobei ein Abstand von 20 – 40 Basenpaaren optimal ist. Um mögliche „off-target“-Effekte zu minimieren, kann ein Blast der Protospacer-Sequenz gegen das *C. reinhardtii* Genom durchgeführt werden (Phytozome 10). Dabei ist vor allem darauf zu achten, dass die 10 Basenpaare des Protospacers unmittelbar vor der PAM-Sequenz möglichst wenig weitere homologe Sequenzen innerhalb des Genoms aufweisen.
3. Für eine konstitutive Expression von Cas9 ist eine Fusion mit dem  $c_r$ BLE bisher die einzig erfolgreiche Strategie. Transformationen dieser Stämme mit *in vitro* hergestellter gRNA-RNA ermöglichen eine transiente Applikation, um cytotoxische Effekte zu verringern.
4. Für eine Plasmid codierte Transkription hat sich der U6-Promotor aus Weizen als funktional in *Chlamydomonas* erwiesen.
5. Das pLSLR-Expressionssystem kann für eine transiente Expression von Cas9 verwendet werden. Einzelsträngige Oligodesoxynukleotide können als Template verwendet werden, allerdings sollten die nicht-homologen Sequenzen gegenüber dem Zielgen klein gehalten werden. Idealerweise handelt es sich dabei um eine Punktmutation.
6. Die Wahl eines geeigneten Stammes für die homologe Integration eines Templates in ein Zielgen beschränkt sich auf CW15-302. Die CAF1-Dysfunktion verursacht eine erhöhte Aktivität der homologen Rekombination in diesem Stamm. Zusätzlich verbessern die Synchronisation der

Kultur in einem Tag-Nacht-Zyklus und die Transformationen kurz vor Beginn der S-Phase die homologe Rekombination mit Zielsequenzen. Deletionsversuche durch NHEJ sollten möglichst zu einem Zeitpunkt erhöhter Transkription durchgeführt werden, wodurch eine bessere Zielerkennung durch Cas9 ermöglicht wird. Dies wäre im Fall der Photorezeptoren gegen Ende der Dunkelphase.

## 4.4 Physiologische Analysen von $\Delta PHOT$ und $\Delta COP3$

### 4.4.1 Phototropin und der Augenfleck

Der Augenfleck der Grünalgen wurde lange als relativ statische Struktur angesehen, die für die Lichtwahrnehmung verantwortlich ist. Erst seit kurzem besteht die Theorie, dass der Augenfleck ein dynamisches Organell sein könnte, welches in Verbindung mit Platinglobuli und anderen physiologischen Prozessen steht (Kreimer, 2009; Boyd et al., 2011). In den Versuchen wurde gezeigt, dass sowohl die Größe des Augenflecks also auch das Niveau des Photorezeptors ChR1 lichtabhängig reguliert werden. Zudem konnte belegt werden, dass der Blaulichtrezeptor Phototropin ein Hauptregulator dieser Adaptationsprozesse ist. Für die Grünalgen ist es wichtig, das Umgebungslicht wahrzunehmen und sich an veränderte Bedingungen anpassen zu können. Die Experimente bestätigten, dass sowohl die tägliche Belichtungsdauer als auch die Lichtintensität die Augenfleckgröße reguliert. Phototropin ist der Regulator dieses Prozesses, was verschiedene Ursachen haben kann. Zum einen kann der Photozyklus der beiden LOV-Domänen von einigen Sekunden über mehrere Minuten dauern (Guo et al., 2005) und deckt somit eine große Bandbreite an Aktivierungsmöglichkeiten ab. Außerdem stellt der von Y. Lu gefundene proteolytische Abbau von  $^{Cr}PHOT$  (Lu, 2006) möglicherweise eine weitere Regulationsebene dar, welche im Bereich von Stunden aktiv sein kann. Phototropin wurde im Augenfleck-Proteom entdeckt, jedoch war bislang die Funktion unbekannt und erst mit den vorliegenden Ergebnissen konnte eine Funktion nachgewiesen werden. Die Beobachtungen, dass im Phototropin Deletionsstamm  $\Delta PHOT^{G5}$  keine lichtabhängige Regulation der Augenfleckgröße stattfindet waren der erste Hinweis auf eine Beteiligung von PHOT an diesem Vorgang. Die Überexpression von Phototropin in  $\Delta PHOT^{G5}$  stellte die lichtabhängige Adaptation des Augenflecks wieder her und bewies somit eindeutig, dass Phototropin diesen Prozess reguliert und eine Überexpression der Kinasedomäne zu einer lichtunabhängigen Verkleinerung des Augenflecks führt. Die Kontrollexperimente zeigten, dass funktional inaktivierte Mutanten der verwendeten Konstrukte nicht zu einer Komplementierung des Phänotyps führten.

Die unterschiedlichen Effekte auf das ChR1-Proteinniveau (z.B. der lichtunabhängige Abbau durch Überexpression der Kinase oder der fehlende lichtabhängige Abbau in  $\Delta PHOT^{G5}$ ) schaffen eine direkte Verbindung von Phototropin zur Phototaxis. Ähnlich wie die Beobachtungen an höheren Pflanzen (Kong et al., 2007) konnten auch in *Chlamydomonas* durch Überexpression der Kinase lichtunabhängig physiologische Veränderungen, wie Reduktion der Augenfleckgröße, ChR1 Degradation und Änderung des phototaktischen Verhaltens, erzeugt werden. Daher ist die

---

Kinaseaktivität ein wichtiger Faktor der Langzeitadaptation des Augenflecks an die Lichtumgebung. In höheren Pflanzen konnten zwar durch Überexpression der N-Terminalen Photorezeptor-Domänen keine physiologischen Antworten erkannt werden (Kong et al., 2007), in den hier durchgeführten Experimenten konnte aber eine klare Veränderung der Augenfleckgröße durch Überexpression von LOV1+2 detektiert werden. Eine mögliche Ursache für eine fehlende physiologische Antwort in früheren Experimenten könnten Unterschiede in der experimentellen Durchführung sein. In den Arbeiten von Kong et. al wurde C-Terminal ein GFP angehängt, welches möglicherweise eine Interaktion mit anderen Proteinen verhinderte. Dies wäre eine mögliche Erklärung, warum die Kinasedomäne in *C. reinhardtii* proteolytisch entfernt und nicht einfach durch Dephosphorylierung an Ser-611 inaktiviert wird. Dieser proteolytische Abbau ist abhängig von der Lichtintensität (Lu, 2006). Bei hoher Lichtintensität erhöht sich der Anteil an PHOTΔ20 und der weitere Abbau an LOV1+2. Dieser komplexe biochemische Vorgang in Verbindung mit einer Lichtregulation des Volllängen-Proteins macht eine Interpretation der Ergebnisse sehr schwierig. Bisher war bereits von atPhot1 und atPhot2 eine funktionale Überlappung bekannt (Christie, 2007). In ähnlicher Weise konnte in den hier durchgeführten Experimenten eine funktionale Überlappung von LOV1+2 und der Kinase gefunden werden. Da *C. reinhardtii* nur über ein Phototropin-Gen verfügt, könnte diese synergistische Funktionsweise der Domänen ein Äquivalent zum Vorhandensein von zwei Phototropinen darstellen. Umgekehrt wäre es natürlich auch denkbar, dass bei zwei vorhandenen Phototropinen in einer der Versionen die Kinase eine erhöhte Funktion hat und in der zweiten Version LOV1+2.

### 4.4.2 Phototropin und die Kanalrhodopsine

Die Experimente haben ergeben, dass Phototropin die Augenfleckgröße reguliert sowie unabhängig davon die Kanalrhodopsin-1 Proteinmenge lichtabhängig reduziert. Für Kanalrhodopsin-2 ist nicht endgültig geklärt, ob Phototropin auch hier als Regulator wirkt. Die biochemische Analyse zeigte nur geringfügige Änderungen der Proteinmenge, zwischen dem Licht- und Dunkelzustand in Stamm CW15-302. Auch eine vermutete Kompensation der ChR1-Deletion durch erhöhte Mengen an ChR2 konnte biochemisch und physiologisch ausgeschlossen werden. In den Deletionsstämmen betrug der Anstieg von ChR2 lediglich 5% (Abbildung 44). Unter Einbeziehung der RNA-Seq-Daten aus Kapitel 3.5 muss berücksichtigt werden, dass die gemessene Transkriptmenge von *COP4*, verglichen mit *COP3*, nur 20% beträgt. Vor diesem Hintergrund sind die gemessenen Änderungen der Proteinmengen an ChR2 in CW15-302 und den ChR1-Deletionsstämmen schwer zu interpretieren. Die geringen Änderungen auf Proteinebene, sprechen gegen eine Regulation durch Phototropin. Betrachtet man allerdings die

relative Änderung der Transkriptmenge nach Applikation von Licht, sieht man eine genaue Korrelation der prozentualen Änderung an mRNA, was wie für *COP3* gezeigt, für eine Regulation durch Phototropin spricht (Abbildung 44 C).

Die Analyse der absoluten Transkriptmenge von *COP3* und *COP4* zeigte, dass fünfmal mehr *COP3*-Transkripte detektiert werden konnten. Die Änderung nach Applikation von Licht auf Ebene der mRNA konnte auch biochemisch für ChR1 gezeigt werden (Abbildung 43).

Überraschenderweise konnte durch Überexpression der PHOT-Kinasedomäne als auch der LOV-Domänen, in motilen *Chlamydomonas*-Stämmen, eine Änderung des phototaktischen Verhaltens induziert werden. In beiden Fällen trat eine Inversion der Reaktion auf Blaulicht auf. Die Überexpression der Kinasedomäne in CC-125 zeigte eine deutliche Umkehr von positiver zu negativer Phototaxis. Zellen des Stammes CC-125 zeigten eine veränderte Reaktion nach vorangegangener Dunkelinkubation. Die Überexpression der Kinasedomäne in CC-125\_KIN bewirkte ein identisches Verhalten der Zellen unabhängig von Licht- oder Dunkelinkubation (Abbildung 44). Dies läßt den Schluss zu, dass die Überexpression der Kinasedomäne einen Zustand hoher Lichtintensität imitiert. Auch die Überexpression der LOV-Domänen hatte denselben, wenn auch leicht abgeschwächten, Effekt. Eine einfache Erklärung für diesen Sachverhalte zu finden ist sicherlich nicht möglich.

Ein Erklärungsversuch liegt in den bisher bekannten Interaktionspartner von Phototropin und dessen funktionalen Domänen. *In vitro* Experimente haben gezeigt, dass heterolog exprimiertes und aufgereinigtes LOV1+LOV2-Protein, an ebenfalls aufgereinigte Kinasedomänen binden können. Dies ist speziell interessant in anbetracht der hier erstmals beschriebenen physiologischen Funktion von LOV1+LOV2 ohne Kinasedomäne. Daher könnte ein möglicher Abbau der PHOT-Kinase dazu dienen, LOV1+LOV2 als lichtaktivierbare Regulatoreinheit für weitere Kinasen bereitzustellen.

.

## 5. Material und Methode

### 5.1 Molekularbiologie

#### 5.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Als DNA-Polymerase wurde die Phusion Polymerase der Firma Thermofisher Scientific verwendet. Aufgrund des hohen G/C-Gehalts des *Chlamydomonas reinhardtii* Genoms wurde zu allen PCR-Ansätzen standardmäßig 1M Betain zugegeben was die Bildung möglicher Sekundärstrukturen reduziert (Sahdev et al., 2007). Um optimale Bedingungen zu erhalten, wurden mit 20 µl Ansätzen Gradienten-PCRs durchgeführt. Dabei wurde der Thermocycler mit einem Gradienten verschiedener Annealing-Temperaturen programmiert, die zwischen 55° und 65° Celsius lagen. Bei weiteren PCRs konnte dann die optimale Temperatur verwendet werden.

#### 5.1.2 Restriktionsverdau der DNA

Für den Restriktionsverdau doppelsträngiger Plasmid-DNA wurden Enzyme der Firma Fermentas verwendet (FastDigest). Der Verdau erfolgte für ~30min bei 37°C.

#### 5.1.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von Plasmid-DNA mit einem DNA-Insert, wurde die T4-DNA Ligase (Fermentas 5 U/µl) des T4 Bakteriophagen verwendet. Vor der Ligation wurden Insert und Vektor mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten und anschließend aufgereinigt. Das linearisierte Plasmid wurde zusätzlich mit alkalischer Phosphatase (Fermentas, FastAP) dephosphoryliert um eine Selbstligation zu verhindern.

#### 5.1.4 Plasmid-DNA

Für die Transformation von *E.coli* wurden die Bakterienstämme DH5α und XL-1-Blue verwendet. Die Transformation erfolgte modifiziert nach Hannahan (1983). Dazu wurden die kompetenten Zellen (25-50µl) für 10min auf Eis aufgetaut und nach Zugabe von 50-100 ng Plasmid-DNA für weitere 10 min auf Eis inkubiert. Daraufhin erfolgte der Hitzeschock bei 42° Celsius für 45 s. Die Zugabe von 300 µl SOC-Medium erlaubt es den Zellen, sich zu regenerieren. Nach einstündiger Inkubation im Schüttler bei 37° Celsius wurden für die Selektion von Transformanten 50 µl auf



LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Die Anzucht von *Escherichia coli* XL-1-Blue welche für die Isolation von Plasmid-DNA benötigt wurden, erfolgte in sterilen 15 ml Röhrchen. 5 ml Luria-Bertani (LB)-Medium wurden dazu von einer Einzelkolonie mit einem sterilen Zahnstocher angeimpft. Die Kultivierung erfolgte über Nacht bei 37° Celsius in einem Schüttelinkubator (180 rpm). Die Anzucht größerer Kulturen erfolgte in Erlenmeyerkolben die mit 2-5 ml Vorkultur angeimpft wurden. Entsprechend der auf dem Vektor liegenden Resistenz, wurde dem Medium ein Antibiotikum zugesetzt. Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte mit Kits der Firma Macherey-Nagel (Nucleospin-Plasmid) und wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

### 5.1.5 DNA-Gelelektrophorese

DNA-Gelelektrophoresen wurden standardmäßig mit 1%igen Agarosegelen in TAE (Tris-EDTA-Acetat)-Puffer durchgeführt. Die DNA-Proben wurden dabei mit 6x Probenpuffer versetzt und bei maximal 5V/cm Elektrodenabstand aufgetrennt. Für die Visualisierung der DNA-Banden wurden dem Gel 0,5 mg/l Ethidiumbromid (Sambrook + Russel, 2001) zugesetzt. Die DNA-Banden konnten dann unter UV-Licht (254 nm + 306 nm) detektiert werden. Für die Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen oder Lösungen wurde das Nucleospin-Gel Extraction<sup>®</sup>Kit (Fa. Machery-Nagel) nach Angaben des Herstellers verwendet.

## 5.2 Biochemische Methoden

### 5.2.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Für die Bestimmung von Protein-Konzentrationen aus Zellextrakten von *E.coli*- oder *C. reinhardtii*-Kulturen wurde das BIO-RAID DC Protein Assay<sup>TM</sup> (BIO-RAID, Hercules, USA) nach Angaben des Herstellers verwendet. Durch photometrische Messungen (Beckman Coulter, DU 530) der Absorption bei 650- 750 nm konnte die Konzentrationsbestimmung der Proteine erfolgen. Dazu wurde eine Standardkurve mit BSA (Bovines Serum Albumin) erstellt. Das BIO-RAID DC Protein Assay<sup>TM</sup> ist nicht für SDS- oder DTT- haltige Lösungen geeignet. Daher wurde in solchen Fällen eine photometrische Messung mit Amido-Black (Popov et al., 1975) gefärbten Proteinen durchgeführt.

### 5.2.2 Polyacrylamid Gel Elektrophorese (PAGE)

Bei Analysen für die Selektion von positiven *C. reinhardtii* Transformanten wurden 200 µl Flüssigkultur aus 96-well Mikrotiterplatten pelletiert (13200 rpm / 1 min; Eppendorf Microcentrifuge 5420) und der Überstand verworfen. Zellwandhaltige Stämme wurden in 15-30 µl SBA-Puffer (0,1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,1 M DTT) resuspendiert. Nach Zugabe von 20 µl SBB-Puffer (30% Sucrose, 5% SDS) wurde die Zellsuspension für 30 min auf höchster Stufe gevortext. Durch mehrfaches Einfrieren bei -80° Celsius und anschließendem Auftauen, konnte bei Bedarf eine verbesserte Zelllyse erreicht werden. Für die anschließende Beladung der Polyacrylamid-Gele wurde den Proben 5 µl 4x SDS Probenpuffer (Laemmli, 1970) zugegeben und die Probe für 5 Minuten im Wasserbad bei 100°C inkubiert. Zellwandlose-Stämme wurden direkt in 4x SDS-Probenpuffer resuspendiert und für 5 min bei 95°C gekocht. Durch erneute Zentrifugation konnte das Zelldebris entfernt werden. Die Beladung der Gele erfolgte mit 15 µl der Proben. Die SDS-Gelelektrophorese (Schägger, 1994) wurde mit 8-15% Polyacrylamid-Gelen durchgeführt.

**Tabelle 5 Puffer SDS-PAGE**

*Rezept 4x SDS-Probenpuffer*

Rezept 4x SDS-Probenpuffer	
Tris-HCl 0,5M pH 6,8	12,5% (v/v)
SDS	3% (w/v)
Glycerin	25% (v/v)
β-Mercapto-Ethanol	5% (v/v)
Bromphenolblau	1% (w/v)
ddH <sub>2</sub> O	

*Rezept SDS-Laufpuffer*

Rezept SDS-Laufpuffer 10x	
SDS	1,0% (w/v)
Tris	3,01% (w/v)
Glycerin	14,4% (w/v)
ddH <sub>2</sub> O	

### 5.2.3 Coomassie Brilliant Blau Färbung

Nach dem elektrophoretischen Trennvorgang wurde das Gel gestoppt und in die Coomassie-Färbelösung gegeben. Als Farbstoff diente Coomassie-Brillant-Blue R250 das in Methanol oder Ethanol gelöst, der Färbelösung zugegeben wird. Der Farbstoff lagert sich an basische und saure Aminosäuren-Seitenketten an, und färbt so die Proteine im Gel unspezifisch. Die Färbelösung enthält neben dem Farbstoff noch Essigsäure, um die Proteine im Gel zu fixieren. Nach 30 Minuten oder Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur auf einem Schüttelinkubator wurde das Gel in Wasser überführt und zum Entfärben mehrmals in der Mikrowelle aufgeköcht bis alle Banden gut sichtbar und der Hintergrund reduziert war. Das Wasserbad wurde dabei mehrmals gewechselt.

### 5.2.4 Western-Blot-Analysen

Für die Immunodetektion von spezifischen Proteinbanden mit Antikörpern wurden die Polyacrylamid-Gele nach der SDS-PAGE mit einem Semi-Dry-Blotter auf Nitrocellulose-Membranen (Hybond™-C Extra 0,45 µm Porengröße, Fa. Amersham, Piscataway, NJ, USA) übertragen (2 mA/cm<sup>2</sup> Membranfläche, 15V, 45 min).

### 5.2.5 Ponceau-S Färbung

Für die Überprüfung des erfolgten Transfers der Proteine auf die Nitrocellulose-Membran wurde der Blot anschließend mit Ponceau-S-Lösung gefärbt. Ponceau-S färbt reversible alle vorhandenen Proteine. Speziell für die Beurteilung möglicher Deletionsmutanten ist es wichtig die Beladung einzelner Spuren beurteilen zu können.

### 5.2.6 Immunologische Proteindetektion

Die mit Ponceau-S gefärbten Membranen wurden in Blockierpuffer (PBS-Puffer + 0,1% Tween20 + 5% Magermilchpulver) bei Raumtemperatur entfärbt. Die im Blockierpuffer enthaltenen Milchproteine blockieren Bindungsstellen der Membran, an die Antikörper unspezifisch binden könnten. Primäre Antikörper wurden in frischem Blockierpuffer oder PBS-T in Verdünnungen von 1:500 bis 1:10000 verwendet. Als primäre Antikörper für Analysen wurden verwendet: (1) Anti-ChR1 C-terminus (aufgereinigt, 1:10 000); (2) Anti-<sup>Sh</sup>BLE (1:2000); Anti-LOV1 (1:2000). Als sekundäre Antikörper wurden Anti-Rabbit IgG oder Anti-Mouse IgG Antikörper aus der Ziege verwendet. Konjugate der Antikörper waren hierbei entweder alkalische Phosphatase (AP) (Firma Pierce, Rockford, USA), IRDye800 oder IRDye700 (Fa. Licor). Die Blotting-Membranen wurden über Nacht mit den in Blockierpuffer verdünnten primären Antikörpern inkubiert. Danach folgten drei Waschschrte in PBS-T (3x 10 min; PBS-Puffer + 0,1% Tween20). Anschließend wurden die Membranen mit den sekundären Antikörpern (1:2000) für mindestens zwei Stunden hybridisiert. Darauf folgten vier Waschschrte (1x 15 min, 3x 5 min) in PBS-T.

### 5.2.7 Zellkultur und Medien

*C. reinhardtii*-Kulturen wurden in einem sterilen Glaskolben in TAP-Medium kultiviert (Hoover, 1989). Dies geschah unter Schütteln (180rpm) entweder im Dauerlicht oder in einem 12h / 12h Tag-Nacht-Zyklus (25W/m<sup>2</sup>).

**Tabelle 6 Tris-Acetat-Phosphat-Medium***Rezept TAP-Medium*

<b>TAP-Medium (für 1 l)</b>	
20 mM Tris-HCl	2,88 g
Salzlösung	50 ml
Spurenelementelösung (Hutner)	1 ml
Kaliumphosphatpuffer	1 ml

*Rezept Salzlösung*

<b>Zusammensetzung Salzlösung (für 1 l)</b>	
NH <sub>4</sub> Cl	8 g
MgSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	2 g
CaCl <sub>2</sub> • 2H <sub>2</sub> O	1 g

*Rezept Kaliumphosphatpuffer*

<b>Zusammensetzung Kaliumphosphatpuffer (für 1 l)</b>	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	108 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	56 g
ph 7,0 mit Essigsäure titriert	

*Rezept Hutners Spurenelementelösung*

<b>Hutners Spurenelementelösung (für 1 l)</b>	
ZnSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	22,0 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	11,4 g
MnCl <sub>2</sub> • 4H <sub>2</sub> O	5,1 g
FeSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	5,0 g
CoCl <sub>2</sub> • 6H <sub>2</sub> O	1,6 g
CuSO <sub>4</sub> • 5H <sub>2</sub> O	1,6 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> • 2H <sub>2</sub> O	1,1 g
EDTA	50,0 g

**5.2.8 Transformation von *C. reinhardtii***

Für die Transformation von *C. reinhardtii* wurde vorwiegend die Glasperlenmethode angewandt (Kindle, 1990). Dazu wurden vegetative Zellen bei einer Dichte von  $2 \times 10^6$  bis  $7 \times 10^6$  Zellen/ml in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit einem automatisierten Zellzähler (Nexcelom Bioscience, Celometer Vision). Die Zellen wurden bei maximal 900g für zehn Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und bei Bedarf für den Verdau der Zellwand in Gameten-Autolysin resuspendiert. Das Autolysin konnte mehrmals verwendet werden und wurde vor jeder Anwendung steril gefiltert (Firma Whatmann, Puradisc 25 AS, 45 µm Porengröße). Nach 30 minütiger Inkubation auf einem Schüttler bei Raumtemperatur, sollte der Zellwandverdau abgeschlossen sein. Zur Kontrolle wurde eine Probe auf einem Objektträger mit

einprozentiger Triton-X-100-Lösung versetzt. Nach erfolgreichem Abbau der Zellwand lysieren die Zellen auf dem Objektträger nach fünf Minuten. Durch erneute Zentrifugation (900g, RT) wurden die Zellen pelletiert und mit TAP-Medium für die Transformation auf eine Zelldichte von  $3 \times 10^8$  Zellen/ml eingestellt. 300 µl der Zellsuspension wurden dann zu 0,3 g sterilen Glasperlen ( $\varnothing$  45 µm) in einem 2 ml Reagenzgefäß gegeben. Nach Zugabe von DNA erfolgte das Vortexen bei voller Leistung (Heidolph Vortex, Typ 54117, 2400 UpM). Anschließend wurden die Zellen in einen 100 ml Erlenmeyerkolben mit 50 ml TAP überführt und über Nacht bei kontinuierlichem Licht ( $25 \text{ W/m}^2$ ) und 25° Celsius inkubiert. Dies dient dazu, den Zellen genügend Zeit zur Regeneration und Expression des Resistenzgens zu geben. Am nächsten Tag wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 900g für fünf Minuten pelletiert. Das Pellet wurde vorsichtig in TAP Medium aufgenommen und auf 1% TAP-Agar-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Anschließend wurden die Platten bei kontinuierlichem Dauerlicht ( $25 \text{ W/m}^2$ ) und 25° Celsius für 6-15 Tage inkubiert, bis die ersten Kolonien sichtbar wurden.

### 5.2.9 Isolation genomischer DNA aus *C. reinhardtii*

Für die Isolation genomischer DNA aus *C. reinhardtii* wurde das Nucleospin® Plant II Kit der Firma Macherey Nagel nach Angaben des Herstellers verwendet. Für die schnelle Analyse von kürzeren Fragmenten (< 700bp) wurde die von Cao et al. (2009) beschriebene Methode der Kolonie-PCR verwendet (5%-Chelex).

### 5.2.10 Phototaxis Assay

Für die Bestimmung des phototaktischen Verhaltens wurden Lichtstreuemessungen nach der von Schaller et al. (Schaller et al., 1997) beschriebenen Methode durchgeführt. Stamm CC-806 welcher nur negative Phototaxis zeigt, wurde dabei als Referenz verwendet. Um eine gleichmäßige phototaktische Antwort zu erhalten wurden die zu analysierenden Kulturen auf Stickstofffreies Medium (NMM- Nitrogen Minimal Media) gesetzt und über Nacht im Licht geschüttelt. In Vorversuchen zur Analyse der Phototropin-Überexpressionsstämme wurde überprüft, ob die Ionenzusammensetzung des Mediums sich unterschiedlich auf die Stämme auswirkt. Im Standardmedium, dass 10mM  $\text{K}^+$  enthält konnte kein signifikanter Unterschied der Stämme CC-125 und CC-125\_KIN erkannt werden. Jedoch zeigten sich Unterschiede wenn kein zusätzliches Kalium dem Medium zugegeben wurde. CC-125\_KIN zeigt stärkere Signale, wohingegen CC-125 eine zeitabhängige Abnahme der Signalstärke zeigte. Diese Abnahme war zu erwarten, da Kalium für die Repolarisation der Zellmembran benötigt wird (Govorunova et al., 1997). Aufgrund dieses Unterschiedes in der Kaliumabhängigkeit der phototaktischen Antwort, und zum besseren

Vergleich mit zuvor durchgeführten elektrophysiologischen Messungen, wurden die Kulturen vor den Messungen in 10 mM HEPES, 81  $\mu\text{M}$   $\text{MgSO}_4$  und 100  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$  bei pH 6.0 überführt. Licht-/ Dunkeladaptation wurde durch aufteilen der Kultur in zwei Kolben erreicht, wobei einer der Kolben mit Aluminiumfolie umwickelt wurde. Für die Dunkeladaptation wurden die Zellen mindestens eine Stunde inkubiert. Als Reizlicht kamen in den Lichtstremessungen LED's folgender Wellenlängen zu Einsatz: 405nm (150  $\mu\text{mol}$  Photonen  $\text{m}^{-2}/\text{s}^{-1}$ ) und 470 nm (20  $\mu\text{mol}$  Photonen  $\text{m}^{-2}/\text{s}^{-1}$ )



Sequenzen der Zinkfinger-Nukleasen:

SacI-KpnI Fragment: **HSP70A::NLS::HAtag::Zif268::FokI::3'rbcs2**

Farbgebung: **HSP70A**; **Startcodon**; **SV40 nuclear localization signal (NLS)**; **HA-tag**. **Zif268 DNA-Bindedomäne**; **FokI Nukleasedomäne**.

GAGCTCGCTGAGGCTTGACATGATTGGTGCATGTTTGTATGAAGCTACAGGACTGATTTGGCGGGCTATGAGGGCGCGGAAGCTCTGGAAGGGCCGCGATGGGGCGCGGGC  
GTCCAGAAGGCGCCATACGGCCCGCTGGCGGCACCCATCCGGTATAAAGCCCGCGACCCGAACGGTGACCTCCACTTTAGCGACAACGAGCACTTATACATACGCGACTATTC  
TGCCGCTATACATAACCACTCAGCTAGCTTAAGATCCCATCAAGCTTCGAGATGGCCAGCAGCCCCCAAGAAGAAGCGCAAGTGGCCGGCCGTACCCGTACGACGTGCCGGAC  
TACGCCGAGCCCGGGAGCAAGACCCCCACAGAGCGCCCTACGCCTGCCCGTGGAGAGCTGCGACCGCCGCTTCAGCCGCGAGCGACGAGCTGACCCGCCACATCCGCAT  
CCACACCGGGCAGAAGCCCTTCAGTGCCGATCTGCATGCGCAACTTCAGCCGCTCGGACCACCTGACGACCCACATTCGGACGCACACGGGCGAGAAGCCGTTGCGCTGCGA  
CATCTGCGGCCGGAAGTTCGCCGCTCGGACGAGCGCAAGCGCCACACCAAGATCCACCTGCGCGCGCGCCCGCGCCCTGGTgaagagcagctggaggagaagaagtcggagctgcgca  
caagctgaagtacgtcccccaggtacatcagctgatcgagatcgccgcaacagcaccagcagccatcctggagatgaaggtcatggagttctcatgaaggtgtacggctaccgccaagcaccctggcgagccgcaagccc  
gagcgcccatctacacgtggcgagcccatcgactacggctgatcggtgacaccaaaggcctacagcgccgctacaacctgccattggccagcgagagatcgagcgtacgtggaggagaaccagacgccaacaagcat  
caacccaacgagtggtgaaggtgtacccagcagcgtgaccgagttcaagttctgtgagcgccactcaagggaactacaagccagctgacgcctgaaccacatcaccaactgcaacggcgagctcgtcggtggagg  
agctgctgatggcgagatgaagcgccgacccctgagggaggtccgccgaagttcaaacgagcgagatcaacttcaataaGGATCCCCGTCCTGTGTAATGGAGCGCTCGTTGATCTGAGC  
CTTGCCCCCTGACGAACGCGGTGGATGGAAGATACTGCTCTCAAGTGCTGAAGCGGTAGCTTAGCTCCCCGTTTCGTGCTGATCAGTCTTTTCAACACGTAAAAAGCGGAGGATT  
TTGCAATTTTGTGGTTGTAACGATCCTCCGTTGATTTGGCCTCTTCTCATGGCGGGCTGGCGTATTGAAGCGGTACC

Zif268-FokI Proteinsequenz:

MASSPPKKKRKVGPRYPYDVPDYAEPGSKTPPHERPYACPVESCDRRFSRDELTRHIRHTGQKPFQCRICMRNFSRDLHTTHIRHTGK  
PFACDICGRKFARSDERKRHTKIHLRAAARAlvkseleekkselrhklkypheyieliearnstqdrilemkvmeffmkvygyrgkhlggsrkdgaiyvtgspid  
ygvivdtkaysggnlpiqgademqryveenqtrnkhipnewwkvpssvtefkflfvsghfkgnykaqlrlnhitncngavlsveelliggemikagtltleevrrkfng  
einf

Zinkfinger-Nuklease *COP3\_L1*.

Mutationen Q486E und I499L (Miller) in Rot.

MASSPPKKKRKVGPRYPYDVPDYAEPGEKPYKPECCKSFSRSDKLVRHQRTHTGEKPYKPECCKSFSQRAHLERHQRTHTGEKPYKPE  
CGKSFSDPGHLVRHQRTHTGAAARALVKSELEEKSELRHKLKYPHEYIELIEARNSTQDRILEMKVMEFFMKVYGYRGKHLGGSRKPDGA  
IYTVGSPIDYGVIVDTKAYSGGYNLPIGQADEMERVYEENQTRNKH<sup>L</sup>NPNEWWKVPSSVTEFKFLFVSGHFKGNYKAQLTRLNHITNCNGA  
VLSVEELLIGGEMIKAGTLTLEEVRRKFNNGEINF

Zinkfinger-Nuklease *COP3\_L2*:

MASSPPKKKRKVGPRYPYDVPDYAEPGEKPHICHIQGCGKVYGRSDHLARHLRWHTGERPFMCTWSYCGKRFTQSGHLQRHKRTHTEK  
KFACPECPKRFMDRSHLARHIKHTHTGAAARALVKSELEEKSELRHKLKYPHEYIELIEARNSTQDRILEMKVMEFFMKVYGYRGKHLGGS  
KPDGAIYTVGSPIDYGVIVDTKAYSGGYNLPIGQADEMERVYEENQTRNKH<sup>L</sup>NPNEWWKVPSSVTEFKFLFVSGHFKGNYKAQLTRLNHIT  
NCNGAVLSVEELLIGGEMIKAGTLTLEEVRRKFNNGEINF

Zinkfinger-Nuklease *COP3\_R*:

MASSPPKKKRKVGPRYPYDVPDYAEPGERPFQCRICMRNFSRGDHLDRHTRHTGKPFQCRICMRNFSLKEHLTRHLRHTGKPFQCR  
CMRNFSDPNLRHLRHTHTGAAARALVKSELEEKSELRHKLKYPHEYIELIEARNSTQDRILEMKVMEFFMKVYGYRGKHLGGSRKPDGA



GGAGGTCGCCGCAAGTTCAAACACGGCGAGATCAACTTCTAATAAGGATCCAAARALVKSELEKKSELRHKLKYVPHEYIELIEIARNPTQ  
DRILEMKVMEFFMKVYGYRGEHLGGSRKPDGAIYTVGSPIDYGVIVDTKAYSGGYNLPIGQADEMQRYVKENQTRNKHINPNEWVKVPS  
SVTEFKFLFVSGHFKGNYKAQLTRLNHKTNCNGAVLSVEELLIGGEMIKAGTLTLEEVRKFNNGEINF

GGAGGTCCGCCGAAGTTC AACCAACGGCGAGATCAACTTCTAATAAGGATCCAAARALVKSELEKKSEL RHKLKYVPHEYIELIEIARN **RTQ**  
DRILEMKVMEFFMKVYGYRG **E**HLGGSRKPDGAIYTVGSPIDYGVIVDTKAYSGGYNLP IQADEMQRYV **K**ENQTRNKHINPNEWWKVYPS  
SVTEFKFLVSGHFKGNYKAQLTRLNH **K**TNCNGAVLSVEELLIGGEMIKAGTLTLEEVRRKFNNGEINF

AAGGTGGCAGCTCTGGGGCCGGGTGGGCTTGTTGGGTGAGGCTGAGCGGCTGGTGTGGTTGGCGGAGGTGGGGATTCCGTAACCTCGTGTGTGGAGGGTGGTGGGGACGA  
GAGGGTCGCTGGTTGGTCACCGAAGCGGTTCCGGGGCGTCCGGCCAGTGCGCGGTGGCCGCGGGAGCAGCGGCTGGACGTGCGCGTGCGCTCGCGGGCTCGCTCGTTCG  
TGACGCGCTGGACTGGGAGCGGTGTCGTTTCATGTCAGTCTGCGCGTGACGTGCCGAGCGGCCCGCTGCTGTCTGTAAGGAGCGTCGACTTGGAGGATCTGACGAGG  
AGCGGAAGGGTGGTCGGGGAGCGGCTTCTCGCCGAGCTGGAGCGGACTCGGCTCGGACGAGGATCTGGCGGTTGCCACGTGACCTGTGCCCGAACAGTGTCTCTG  
ACCCTCGTAACCTGCGAGGTGACCGGGCTGATGACGTGGGCGGggtcggcgtgcggagccgcactcgaatctcgcgtgggtcgtcggagctggccacaggaggaccgtggttcggccggagtggttcgcgg  
cgttctcggaggatcggggcgggtgggtagggcggtatcggaggaaaagctggcggtttaccggctgttgacagagttctttagggagctgagtggttggtggctggtaggggttcgctcgcgtgggtgacacacagtgtggagct  
tgggtagcctacctggcggcgaggagacagcagtgaattctggcagcagctggagccgctgtacctaggagaagagcttacttgcgggagtgccgatttcgctgattgatacgggtagcggagctcggagggtttcgcgctaggggc  
tagcgaaaggcagtggtgaccagggctgggtgggggtgcggccacggtcaattagccacaggagatcaggggaggtaggcacgtgactggtttgcaccccgagtttggcggagctgctgtttgtagattgacgtgtgctgtagc  
cagtgggccaagctgcacaccattgagaagacaaccaacttactggcaatatctccaatgccatactcatgtaattgcaggccatgtgagagtttgcgtgctgcgcgccccggggcgggggggggagcgggtgggggtagg  
gggtcttcagggaacagcagctgagggttcaggggggggggggcgagctttagctaccagccgtgggatgatgcacgatttgcaggagaggatcaacagcagcaacatggtggcttaggacagctgtgggtcagtgagcgg  
acggcagggggaggagcggcgagctcgggagacagggggagacagctgactgtgacatgcagcatcaagcttagatgataccgtcagctcagag

GGGTGTGCTGGCGCTCATGGAGTGAAGCCCATCTGGGGTCTGGGGCGACAGCGTTGGAGTACTGCAACCTCCAACGGGAATGCAATTGGGCACGTTGTTGCTCCATCAGCGCTGT  
TTGGTTCCTGGCGCTATAACGCTGCGGGTATGTCGTTTGTGTCAGACTCTGCCATCGCCACGCCATCTGGACCTTGCTCCAAGAACGCTTGAGTATGATGGGTCACTTTCTGCGT  
GTCAAGGTGCGAGGGCGCGGGGGGACCTGCAAGACAGAGTGTAAATTCACAGGGCGGTAGCAGAGAGCAATGGACCGAAACCCGCTGAGCTACAAGGCCCTATGCC  
TTACGCCGCTCCGACCAACACAGATCGCAACTACCCACCCACCACCATACCACCGAGATCCACGAGCATCTGCTGTACGGCGACATCCGAAGAAGCAGAAGGT  
AACGTGGCTGCCCAGGAGATGGAGGTGGAGACCATGGTGCACGAGGAGGACGACGAGACGAGAAGGTGCCACGGCAAAGTACGCCAACCCGCGACTGTTTCATCATCATGCGCG  
ACCGCCTCAAGGAGAAGGGCTTCGAGACCCGCGCTCGCTGGACGCGCACCCGAACGGCGACGCCGAGGGCAAACGCTGCAGCGGGGGCAAGCCGGAATGGAGATGGGCAAGA  
TGACCGGCATGGGCATGAGCATGGGTGCCGCATGGGCATGGCGAACATCGATTGGGGCGCGTATCTCGCCGTGCCGGACGTGAGTGATGTGCTGTCGCGGGGCGTGC  
GGCGGGGTAGCGCTGGGGCTTGAACAGAAAGACGACGACGCCGCGGAGTATGCTAAGCAGAAAGAGGCGACTTTGGCGCACGTGTGTGCGCCGGCCTTCAGACACCAAGT  
CGTCTGATGTCCGCGCTGCCCTCTACCGCGTACCCACGACGCGTGTCACTCCACCCACCCTACGCTGGCCACCCCTACCCTCACCATCTCTTCAGATCTCATGTTGGACTT  
TTTCCGCGAGCAGTTGCGCGGCTGCCCTGCCCTACGAAGTGGTGGCCGCGCTGGGCGCGGAGAACCCCTCAGCTGGTGCAGCAGGCGCAGTCACTGGGAGGCTGCAGCTTC  
TGCTCATGACCCCCAGTTCTGCGCGACCGCAGTCCACGGGTCTGCTGCCCGCCTCAAGATGGCGGGGACGCGCGCGCGCCTTCGGTGGCGGCAATCGGCCCCATGC  
GGGACTTGATCGAGGGTTGCGGCGTTGACGGCTGGCTGGAGGGCCCCAGCTTTGGCGCCGCATCAACCAGCAGCGCTGGTGGCGCTGATCAACCGCATGCAGCAGGCCAAGAA  
GATGGGCATGATGGGCGTGAGTCAGGGGGGGGGGCTGTGGAGGGGTGGGGTGCGGTGGGCGGAGGCGAGGTGGAGGTGCAGGTTTTGGCTGTACGGAAGGTGTTGTGG  
GGGCTGTGCGACTGCGGAAACATGGGAAGAACAGGGGAGGAGCATGCAAGCTGCGGGAGAGAGCCTACGGTAGGAAGCAGCGGCTTTTCTTGAAGTCTGTTGCGAACT  
GCATGTACCCACCTTACCCTCTGCCCTCATCTTTCTTCAAAAGGTATGGGTATGGGCATGGGCATGGGCATGGGCATGAGCCCATGCAGCAGGCTATGCCGGCATGTGCCCATGA  
TGAACAGCCGCATGACTGGCGGCATGGCGGCGCTCATGGGCGTGCCGTGATGGCATGGGCATGGGCATGAGCCCATGCAGCAGGCTATGCCGGCATGTGCCCATGA  
TGACTAGCAGCCAGCATGATGAGTACGCCCTCCGCCATGAGCGCGG**TCGCGACTACAAGGACCACGACATCGACTACAAGGACGACGACGACAAGGTGTAATGA**cggcgggcgc  
cctgcaggccatgggtggtgagtgagagctatcgagagcactcgaggggactacgattttgaggggagggcttggtagcgagggtttgtgaagcgtgcaacggagatcgcaacacagctcaggccagtcggtactcaacaccccttc  
ttctctcgtgactctctgtgctgctgttgcaacacacagggtcatgccagcccccggcgggcgctggggcaccaaccgctgtttggctctgcgccctctcgtgtagctcgagcccgcatcagccctggatggcgagccgc  
cgcgcgcaccgcgcaccgcgcctggcggcagcgagggcgagatgctgcagcagctgatgacgaggtgctgtagcagcagggctgtgttgccgcgcgctgctgttcaaggagaggtcagggaagcgctagtctggcaacaggga

gttttcggcgatgggattatgggcccagaacagaccggaatggcgctgttgaagaccgccgctcccgacggcgctccgctggtctgctggtgtggcctgttctgacggctgctgggctctgctgtgtattgcagatcaaccgcctgaag  
aacgagctgggagtgtaactgtgcccagcctacggacatat

## Deletions-Template:

5' Homologie *COP3* (2856 - 4512bp) - Großbuchstaben.

3' Homologie *COP3* (4741 - 5411bp) - Kleinbuchstaben.

CGGGTGTGCTGGCGTCCATGGAGTGAAGCCCATCTGGGGTCTGGGCGACAGGCTTGGAGTACTGCAACCTCCAACGGGAATGCAATGGGCACGTTGTTGCTCCATCAGCGCTG  
TTTGGTTCTGGCGCTATAACGCTGCGGGTATGTCTTTGCTGCAGACTCTGCCATCGCCACGCCATCTTGACCTTGCCTCCAAGAACGCTTGGAGTATGATGGGTCACTTTCTGCG  
TGTC AAGGTGCGAGGGGCGCGGGGCGGGGACCTGCAAAGACAGAGTGTAAATTCAGAGGGCGGTAGCAGAGAGCAATGGACCGAAACCGCCTGAGTACAAGGCCCTATGC  
CTTACGCCGCTCCGACCAACACCAGATGCCAACTACCCACCCCCACCACTACCACCGCAGATCCACGAGCAGATCTGCTGTACGGCGACATCCGCAAGAAGCAGAAGGT  
CAACGTGGTGGCCAGGAGATGGAGGTGGAGACATGGTGACGAGGAGGACGAGAGACGAGAAGGTGCCACGGCAAAGTACGCCAACCGGACTGTTTCATCATCATGCGC  
GACCGCTCAAGGAGAAGGGCTTGAGACCCGCGCTCTGTCGACGGCGACCCGAACGGCGACGCCAGGCAACGCTGCAGCCGGCGGAAGCCCGGAATGGAGATGGGCAAG  
ATGACCGGCATGGGCATGGGCATGGGTGCCGATGGGCATGGCGACCATGATTGCGGCCGCTCATCTCGCCGTGCCGGACGTGAGTGATGTGCTGTCGCGGGGCGGTGCG  
GGGCGGGGCTAGCGCTGGGGCTTGAACAGGAAAGAGCAGCAGCAGCGAGTATGCTAAGCAGAAAGAGCGACTTGGCGCAGCTGTGTGCCCGGCTTCAGACACCAAG  
TCGCTGATGTCCGCGCTGCCCTCTACCGCGCTACCCACGACGGTGTACTCCACCCACCTACGCTGGCCACCCCTACCCCTACCATCTCTTCAGATCCATGTTGGACT  
TTTTCCGCGAGCAGTTGCGCGGCTGCCCTGACCACTGGTCCCGCTGGGCGCGGAGAACACCTCCAGCTGGTGACGAGGCGCAGTCACTGGGAGGCTGCGACTTC  
GTCTCATGACACCCGAGTTCTGCGCGACCGCAGTCCACGGGTCTGCTGCCCGCTCAAGATGGCGGGGACGCGCGCGCGGCTTCGCTGGCGGCAATCGGCCCATGC  
GGGACTTGATCAGGGTTGCGGCTGACGCTGGTGAGGGGCCCCAGCTTGGCGCCGATCAACAGCAGGCGCTGGTGCGCTGATCAACCGCATGACGAGGCCAAGAA  
GATGGGCATGATGGCGGTGAGTACGGGGGGGGGGTGTGGAGGGTGGGGTGCGGTGGGCGGAGGCGAGGTGGAGGTGACAGTTTTGGCTGTGACGGAAGGTGTTGTGG  
GGGCTGTGACGACTGCGGAAACCATGGGAAGAACAGGGGAGGAGCATGCAAGCTGCGGGAGAGAGCCTACGGTAGGAAGCAGCGGCTTTCTTGAACCTGTTGCAACCT  
GCATGTACCCACCTCTACCTCTTGCCTCATCTTTCTTCAAAACgcccggcgccatcaggccatgggtggtgagtgagagctatcgagagcactcagggggactacagtttgaggggagggttttgacgg  
cagggttttgagagcgtgcaacggagatgcgaacacagctcaggccagtcggtacctcaaccacctttctctctgctgactcctgtgcatgttgacaccaccagggctcatgcccagccccggcgccgctgggaccca  
accgctgtttggctctgcccctctcgctgagctcgaccccgcatcgccctggcatggcgacgcccggccgcccggccgcccagccgctgctggcgagcgaggccgagatgctgagcagctgagtagcaggggtgctgtgtagca  
gcagggtctgttggcgccgctggcgtttcaaggagggtcagggaaggcggtagtctggcaacgggagtttccggcagggattatgggccaagaacagacgggaatggcgctgttgaagaccgccgctccgacggcgctgctg  
gtctgtggtggtggtgctgtgctgtagcggctgctggcctgtgctgttattgtagatcaaccgctgaagaacgagctggcgagtaactgctggcccagcctacggacatatg

*crfp*:

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACGGGCGTGGTGGCCATCTGGTGGAGCTGGACGGCGACGTGAACGGCCACAAGTTACAGCTGTCCGGCAGGGGCGAGGGCGACGCC  
ACCTACGGCAAGCTGACCTGAAGTTTCATCTGCACGACCGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCTGGTGACCACTTCGGCTACGGCTCGAGTGCTTCGCCCGCTACCCCGAC  
CATATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGAGCCCATGCCGAGGGCTACGTGCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGGGAGGTGAAGTTCTGA  
GGGCGACACGCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCTCGGGCCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTGTACATCATGG  
CCGACAAGCAGAGAAGCGCATCAAGGTGAATCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGTCTGGTGCACTGGCGGACCACTACAGCAGAAACCCCCATCGGCGACGCGCCG  
GTGCTGCTGCCGACAACCACTACTGTCTTACCAGAGCGCCCTGTCCAAGGACCCCAACGAGAAGCGCGACCATGATGGTGTCTGGAGTTCTGTGACCGCCCGCGCATCACCTGT  
GGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

MAKGEELFTGVVPIVELDGDVNGHKFSVSGEGEDATYGKLTLFKICTTGKLPVPWPTLVTTFGYGLQCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEG  
YVQERTIFFKDDGNYKTRAIEVKFEGDTLVNRIELKIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQ  
QNTPIGDGPVLLPDNHYLSYQSALS KDPNEKRDMVLLFVTAAGITLGMDELYK\*

*CrCas9*:

ATGGACTACAAGGACCACGACGGCGACTACAAGGACCACGACATCGACTACAAGGACGACGACGACAAGATGGCCCCGAAGAAGAAGCGCAAGGTGCGCATCCACGGCGTGCCCG  
CCGCGGACAAGAAGTACTCCATGGCCTGGACATGGGCACGAACAGCGTGGGCTGGGCGTGATCACCAGCAGAGTACAAGGTGCCGTCCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACAC  
CGACCGCCACAGCATCAAGAAGAACTGATCGCGCCCTGCTGTTGACTCGGGCGAGACCGCCAGGCGACGCGCTGAAGCGCACCGCGCGCCGCTACACGCGCCGCAAG  
AACCGCATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCAAGAACGAGATGGCCAAAGTGGACGACTCTTCTTCCACCGCTGGAGGAGTCTTCTGTTGGAGGAGGACAAGAACGACGAGCG  
CCACCCCATCTTGGCAACATCGTGACGAGGTGGCTACCACGAGAAGTACCCGACGATCTACCACCTGCGCAAGAAGCTGGTGGACAGCACCGACAAGCGGACCTGCGCCTGA  
TCTACCTGGCCCTGGCGCATGATCAAGTTCCGCGGCCATCTCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACCTCGGACGTGGACAAGCTGTTTCATCAGCTGGTGACAGCTTACA  
ACCAGCTGTTGAGGAGAACCCTGATCAACGCTCTGGGCGTGGACGCCAAGGCGATCTGTCCGCGCGCTTCCAAGAGCGCGCGCTGGAGAACCTGATCGCCAGCTGCCCGGCG  
GAGAAGAAGAAGCGCTGTTCCGCAACCTGATCGCTGAGCTGGGCTGACGCCGAACCTCAAGTCAAGTTCGACCTGGCCGAGGACGCGAAGCTGACGCTGAGCAAGGACA  
CCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCAGATCGGCGACCAAGTACGCGGACCTGTTCTGGCCGCGAAGAACCTGTCGGACGCCATCTGCTGTCGACATCTCTGCGCGT  
AACACCGAGATCACGAAGGCCCTCTGCGCGTCCATGATCAAGCGCTACGACGAGCACCAACAGGACCTGACCTGCTGAAGGCGCTGGTGCGCCAGCAGCTGCCGGAGAAGTA  
CAAGGAGATCTTCTGACCACTCAAGAAGCGCTACGCGGCTACATCGACGGCGGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTTCATCAAGCCATCTGGAGAAGATGGACGGCA  
CGGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGCGAGGACCTGCTGCGCAAGCAGCGACCTTTCGACAACGGCAGCATCCCCACCAAGATCCACTGGCGAGCTGCACGCCATCTGCGC  
CGCCAGGAGGACTTCTACCGTTCTGAAGGACAACCGCGAGAAGATCGAGAAGATCTGACGTTCCGATCCCTACTACGTGGGCGCGTGGCTGCGGCAACTCCCGCTTCCG  
TGGATGACCCGCAAGAGCGAGGAGACCATCACGCCCTGGAACCTTCGAGGAGGTGGTGGAACAGGGCGCCAGCGCGCAGTCTTTCATCGAGCGCATGACCAACTTCGACAAGAACC  
TGCCCAACGAGAAGGTGCTGCCGAAGCACTCCCTGCTGATCAGGACTTCAACCGTGTACAACGAGCTGACGAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGCAAGCCCGCTTCTG  
AGCGGCGAGCAGAAGAAGGCGATGCTGGACCTGCTGTTCAAGCAACCCGAAGGTGACGGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGCTTCGACAGCGTGG  
AGCTGTACCTGTACTACTCTGACAAGCGCCGACATGTACGTGGAACAGGAGGTGGACATCAAGGACAAGGACTTCTGGACAACGAGGAGCAAGGACATCTCTGGAGGAGTCTGGAAG  
GACATCTGCTGACCTGACGCTGTTGAGGACCGCGAGATGATCGAGGAGCGCTGAAAGCAGTACGCCACCTGTTGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGCGCGCGCTA  
CACC GGCTGGGCGCGCTGAGCCGAAGCTGATCAACGGCATCCGCGCAAGCAGTGGGCAAGACCATCTGGACTTCTGAAGTCCGACGGCTTCGGAACCGCAACTTCATGC  
AGCTGTACACGACGACTCGTGACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCAGGTGTGGGCGGAGGGGCACTCCCTGCACGACACATCGCCAACCTGGCGGGCTCCCCCGCATC  
AAGAAGGCGATCTGTCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGGGCCGCCACAAGCCGAGAGAATCTGATGATGAGATGGCCGCGAGAACCAGACACGCGAG  
AAGGGCCAGAAGAAGCGCGAGCGCATGAAGCGCATCGAGGAGGGCATCAAGGAGTGGGCTCGCAGATCTGAAGGAGCACCCCTGGAGAACACCGAGCTGCGAAGCGAG  
AAGCTGTACTCTGTACTACTCTGACAAGCGCCGACATGTACGTGGAACAGGAGTGGACATCAACCGCCTGTCGACTACGACGTGGACACATCTGTGCCCAAGAGCTTCTGAAG  
GACGACTGATGACAACAGGTGCTGACCCGACGCGACAAGAACC GCGGAAGAGCGACAACGTGCCGTGCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAAGAATCTGCGCGCAGCTGCTG  
TGAACGCCAAGCTGATCAGCGAGCGCAAGTTGACAACCTGACCAAGGCCGAGCGCGGCGCTGTGGAGCTGGACAAGCGGGGCTTCATCAAGCGCAGCTGGTGGAGACCCG

## 6. Anhang

CCAGATCACGAAGCACGTGGCGCAGATCCTGGACTCCCGCATGAACACGAAGTACGACGAGAACGACAAGCTGATCCGCGAGGTGAAGGTGATCACCTGAAGTCCAAGCTGGTCA  
GCGACTTCCGCAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGCGCGAGATCAACAACCTACCACGCCCCACGACGCTACCTGAACGCCGTGGTGCCACCGCGCTGATCAAGAAGTACCCCA  
AGCTGGAGAGCGAGTTCTGTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGCGCAAGATGATCGCCAAAGTCGGAGCAGGAGATCGGCAAGGCCACCGCGAAGTACTTCTTACTCCAAC  
ATCATGAACTTCTTCAAGACCGAGATCACGCTGGCCAACGGCGAGATCCGCAAGCGCCCCCTGATCGAGACCAACGGCGAGACGGGCGAGATCGTGTGGACAAAGGGCCGCGACTT  
CGCGACCGTGGCAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACGGGCGGCTTCTCAAGGAGAGCATCTGCCGAAGCGCAACTCGGACAAG  
CTGATCGCCCGCAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGACTCCCCGACCGTGGCCTACAGCGTGCTGTTGGTGCGCAAGGTGGAGAAGGGCAAGTCCAAGAAGC  
TGAAGAGCGTGAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGCAGCTCGTTGAGAGAAGCAACCCATCGACTTCTGGAGGCGAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGAT  
CATCAAGCTGCCGAAGTACTCGCTGTTGAGCTGGAGAACGGCCGAAGCGCATGCTGGCCTCCGCGGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCAGCAAGTACGTG  
AATTCTGTACCTGGCGTCCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCTCGCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCTGTTCTGTGGAGCAGCACAAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGACA  
GATCTCGGAGTTCTCAAGCGCTGATCTGGCCGACGCAACCTGGACAAGGTGCTGAGCGCTACAACAAGCACCAGCAAGCCATCCGCGAGCAGGCGGAGAACATCATCC  
ACCTGTTACCTGACGAACCTGGGCGCCCCGGCGCGTTCAAGTACTTCGACACCACGATGACCGCAAGCGCTACACCAGCACGAAGGAGGTGCTGGACGCGACCTGATCCACC  
AGAGCATCACCGCCTGTACGAGACGCGCATCGACCTGTCGACGTGGGCGGCGACAAGCGCCCGCGGCGACCAAGAAGGCGGGCCAGGCGAAGAAGAAAGTAA

MDYKDHGDYKDHDIDYKDDDDKMAPKKKRKVGIHGVPAAADKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTRHSIKKNLIGALL  
FDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEFSNEMAKVDDSFHRLSEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTD  
KADLRILIYALAHMIKFRGHFLIEGDLNPNDSVDKLFQVLQTYNQLFEEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRENLIAQLPGEKKNLFGNLI  
ALSGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDITYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAANKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLK  
ALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVLKNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFY  
PFLKDNREKIEKILTRIPYVVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEVVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHKSHLLYEYFTVYNELT  
KVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLKKIKDKDFLDNEENEDILEDIVL  
TLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDFANRNFQMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVS  
GQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQL  
QNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVHVPQSFLKDDSIDNKVLTNSDKNRGKSDNVPSEEVVKMKMKNYWRQLLNAKLITQRKF  
DNLTKAERGGELSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNA  
VVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVVYDVRKMIKSEQEI GKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL  
SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEFKNPIDFL  
EAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLEFENGRKMLASAGELQKGNELALPSKYVNFYLAHYEKLKGSPEDEQKQLFVEQHKHYLDEIIQISEFS  
KRVILADANLDKVL SAYNKHDKPIREQAENIIHLFTLNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQSI TGLYETRIDLSQLGGDKRPAAT  
KKAGQAKKKK\*

## 6.3 Barcode-Primersequenzen

**Tabelle 7 Primer-Barcodes**

Barcode01	AAGTCGGA		Barcode25	CAGCATAC
Barcode02	TTGACACC		Barcode26	TAATCCGG
Barcode03	AATCGACC		Barcode27	CATCGCTT
Barcode04	TGTTAGGC		Barcode28	GTGTGTGT
Barcode05	ACGAGAGA		Barcode29	CATTGTGG
Barcode06	TGGTGCAT		Barcode30	GTCTGCAA
Barcode07	GTACAGAG		Barcode31	CCAGGTAT
Barcode08	TGGACGTT		Barcode32	GTATTGGC
Barcode09	AGCAGAAG		Barcode33	CCTTGACA
Barcode10	TGCCTCTT		Barcode34	GGTGTGTT
Barcode11	AGTAGGCA		Barcode35	CGATACGT
Barcode12	TGAGTGGA		Barcode36	GGCTTAGA
Barcode13	ACCTGGTA		Barcode37	CGTAAGAG
Barcode14	TCGGTAGT		Barcode38	GGAATACG
Barcode15	ATAGGAGC		Barcode39	CTATGGCT
Barcode16	TCCTATGG		Barcode40	GCTGAATC
Barcode17	ATCCGTCT		Barcode41	CTCATGTC
Barcode18	TCAGAGAC		Barcode42	GCATGAAG
Barcode19	ATGCATGG		Barcode43	CTCGTAAG
Barcode20	TATGCCAC		Barcode44	GATCTGAC
Barcode21	CAACCAGT		Barcode45	CTGTCATG
Barcode22	TACGTTGC		Barcode46	GAGGACAT
Barcode23	GTCATCCT		Barcode47	CTTCAAGC
Barcode24	TACCGTAG		Barcode48	GAGATTGG

## **Danksagung**

Mein großer und aufrichtiger Dank gilt vor allem Prof. Peter Hegemann für die Bereitstellung dieses komplexen, aber spannenden Themas und den gegebenen Freiheiten bei der Bearbeitung. Vielen Dank für den großen Rückhalt und die jederzeit vorhandene Diskussionsbereitschaft.

Ein ganz großer Dank gilt zuerst den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, vor allem Heide Evers für die tatkräftige Unterstützung in allen Arbeitsbereichen. Bei Dr. Irina Sizova möchte ich mich für die nicht immer einfache jedoch sehr lehrreiche Zusammenarbeit bedanken. Besonders möchte ich mich auch bei Margrit Michalsky bedanken für die Pflege der Algenkulturen und die Hilfe bei den biochemischen Analysen. Danke auch an Mailah Reh für die Aufrechterhaltung des Laborbetriebes und die aufopfernde, passionierte und fröhliche Arbeitsweise. Für die tolle Zusammenarbeit und das entspannte Arbeitsklima ein herzliches Dankeschön an Matthias, Anton, Julia, Meike, Katja, Roman, Benjamin, Jennifer, Lina, Simon, Irina, Christina, Melanie, Thao, Hillary, Angela Piater und natürlich auch alle anderen Arbeitsgruppenmitgliedern.

Einen besonderen Dank auch an die vielen Kooperationspartner:

Allen voran der Arbeitsgruppe um Prof. Georg Kreimer für die tolle Zusammenarbeit im Phototropin-Projekt.

Prof. Feng Zhang für die Zusammenarbeit an den TALENs und dem CRISPR/Cas9-Projekt.

Prof. Suneel Kateriya für die Herstellung der verwendeten Antikörper.

Prof. Maria Mittag und Dr. Katja Prager für die Analysen der komplementierten Phototropin Deletionsmutante und MS-Analysen.

Dr. Maurizio Chioccioli für die Messungen an gCaMP6.

Der Arbeitsgruppe von Prof. Andreas Herrmann, besonders Christian Sieben, Dr. Korte und Roland Schwarzer für die tolle Unterstützung bei der Mikroskopie.

Der Arbeitsgruppe von Prof. Edda Klipp, besonders Dr. Gabrielle Schreiber für die FACS-Analysen und die Light-Cycler-Messungen.

Der Arbeitsgruppe von Prof. Andreas Möglich für die Messungen am Plate-Reader.

Ein ganz besonderer Dank gebührt meinen Eltern, die immer an mich geglaubt haben und mich bei allen Vorhaben unterstützten.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Frau Christine bedanken, die mich wirklich immer unterstützt hat, sich nie beschwert hat, wenn ich das Wochenende wieder im Labor verbracht habe und mich immer liebevoll empfangen hat, auch wenn es wieder später wurde. Vielen lieben Dank für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

---

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die geltende Promotionsordnung der Lebenswissenschaftlichen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin bekannt ist und ich die vorliegende Dissertation in allen Teilen selbstständig angefertigt habe. Es wurden keine anderen Hilfsmittel, Mitteilungen oder Quellen als die angegebenen verwendet und alle Inhalte, die in Wortlaut oder Sinn aus anderen Werken entnommen wurden, wurden durch die Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Ich versichere, dass die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit der vorgelegten Dissertation stehen.

Die vorliegende Arbeit wurde nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder eine andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht. Weiterhin wurde weder die vorliegende Arbeit, noch eine andere Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts hat mich Herr Prof. Peter Hegemann unterstützt.

Berlin, 27.10.2014

Andre Greiner

## 7. Literaturverzeichnis

- Adelman, C.A., and Boulton, S.J.** (2010). Metabolism of postsynaptic recombination intermediates. *FEBS Lett* **584**, 3709-3716.
- Ahmad, M., Jarillo, J.A., Smirnova, O., and Cashmore, A.R.** (1998). The CRY1 blue light photoreceptor of Arabidopsis interacts with phytochrome A in vitro. *Mol Cell* **1**, 939-948.
- Allen, J.** (2002). Photosynthesis of ATP-electrons, proton pumps, rotors, and poise. *Cell* **110**, 273-276.
- Baltes, N.J., Gil-Humanes, J., Cermak, T., Atkins, P.A., and Voytas, D.F.** (2014). DNA replicons for plant genome engineering. *Plant Cell* **26**, 151-163.
- Bartsch, S., Kang, L.E., and Symington, L.S.** (2000). RAD51 is required for the repair of plasmid double-stranded DNA gaps from either plasmid or chromosomal templates. *Mol Cell Biol* **20**, 1194-1205.
- Bedell, V.M., Wang, Y., Campbell, J.M., Poshusta, T.L., Starker, C.G., Krug, R.G., Tan, W., Penheiter, S.G., Ma, A.C., Leung, A.Y., Fahrenkrug, S.C., Carlson, D.F., Voytas, D.F., Clark, K.J., Essner, J.J., and Ekker, S.C.** (2012). In vivo genome editing using a high-efficiency TALEN system. *Nature* **491**, 114-118.
- Beel, B., Prager, K., Spexard, M., Sasso, S., Weiss, D., Müller, N., Heinnickel, M., Dewez, D., Ikoma, D., Grossman, A.R., Kottke, T., and Mittag, M.** (2012). A flavin binding cryptochrome photoreceptor responds to both blue and red light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* **24**, 2992-3008.
- Berthold, P., Tsunoda, S.P., Ernst, O.P., Mages, W., Gradmann, D., and Hegemann, P.** (2008). Channelrhodopsin-1 initiates phototaxis and photophobic responses in *chlamydomonas* by immediate light-induced depolarization. *Plant Cell* **20**, 1665-1677.
- Beumer, K.J., Trautman, J.K., Mukherjee, K., and Carroll, D.** (2013). Donor DNA Utilization during Gene Targeting with Zinc-finger Nucleases. *G3* (Bethesda).
- Bibikova, M., Golic, M., Golic, K.G., and Carroll, D.** (2002). Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics* **161**, 1169-1175.
- Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A., and Bonas, U.** (2009). Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* **326**, 1509-1512.
- Bonente, G., Ballottari, M., Truong, T.B., Morosinotto, T., Ahn, T.K., Fleming, G.R., Niyogi, K.K., and Bassi, R.** (2011). Analysis of LhcSR3, a protein essential for feedback de-excitation in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *PLoS Biol* **9**, e1000577.

- Boyd, J.S., Gray, M.M., Thompson, M.D., Horst, C.J., and Dieckmann, C.L.** (2011). The daughter four-membered microtubule rootlet determines anterior-posterior positioning of the eyespot in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Cytoskeleton (Hoboken)* **68**, 459-469.
- Braun, F.J., and Hegemann, P.** (1999). Two light-activated conductances in the eye of the green alga *Volvox carteri*. *Biophys J* **76**, 1668-1678.
- Briggs, W.R., Beck, C.F., Cashmore, A.R., Christie, J.M., Hughes, J., Jarillo, J.A., Kagawa, T., Kanegae, H., Liscum, E., Nagatani, A., Okada, K., Salomon, M., Rüdiger, W., Sakai, T., Takano, M., Wada, M., and Watson, J.C.** (2001). The phototropin family of photoreceptors. *Plant Cell* **13**, 993-997.
- Cao, M., Fu, Y., Guo, Y., and Pan, J.** (2009). *Chlamydomonas* (Chlorophyceae) colony PCR. *Protoplasma* **235**, 107-110.
- Carreira, A., and Kowalczykowski, S.C.** (2011). Two classes of BRC repeats in BRCA2 promote RAD51 nucleoprotein filament function by distinct mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 10448-10453.
- Carroll, D.** (2011). Zinc-finger nucleases: a panoramic view. *Curr Gene Ther* **11**, 2-10.
- Ceballos, S.J., and Heyer, W.D.** (2011). Functions of the Snf2/Swi2 family Rad54 motor protein in homologous recombination. *Biochim Biophys Acta* **1809**, 509-523.
- Cermak, T., Doyle, E.L., Christian, M., Wang, L., Zhang, Y., Schmidt, C., Baller, J.A., Somia, N.V., Bogdanove, A.J., and Voytas, D.F.** (2011). Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res* **39**, e82.
- Certo, M.T., Ryu, B.Y., Annis, J.E., Garibov, M., Jarjour, J., Rawlings, D.J., and Scharenberg, A.M.** (2011). Tracking genome engineering outcome at individual DNA breakpoints. *Nat Methods* **8**, 671-676.
- Cho, S.W., Kim, S., Kim, Y., Kweon, J., Kim, H.S., Bae, S., and Kim, J.S.** (2014). Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Res* **24**, 132-141.
- Christian, M., Cermak, T., Doyle, E.L., Schmidt, C., Zhang, F., Hummel, A., Bogdanove, A.J., and Voytas, D.F.** (2010). Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics* **186**, 757-761.
- Christie, J.M.** (2007). Phototropin blue-light receptors. *Annu Rev Plant Biol* **58**, 21-45.
- Christie, J.M., Swartz, T.E., Bogomolni, R.A., and Briggs, W.R.** (2002). Phototropin LOV domains exhibit distinct roles in regulating photoreceptor function. *Plant J* **32**, 205-219.
- Christie, J.M., Arvai, A.S., Baxter, K.J., Heilmann, M., Pratt, A.J., O'Hara, A., Kelly, S.M., Hothorn, M., Smith, B.O., Hitomi, K., Jenkins, G.I., and Getzoff, E.D.** (2012). Plant UVR8 photoreceptor senses UV-B by tryptophan-mediated disruption of cross-dimer salt bridges. *Science* **335**, 1492-1496.



- Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., and Zhang, F.** (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* **339**, 819-823.
- Demarsy, E., and Fankhauser, C.** (2009). Higher plants use LOV to perceive blue light. *Curr Opin Plant Biol* **12**, 69-74.
- Doench, J.G., Hartenian, E., Graham, D.B., Tothova, Z., Hegde, M., Smith, I., Sullender, M., Ebert, B.L., Xavier, R.J., and Root, D.E.** (2014). Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation. *Nat Biotechnol*.
- Dreier, B., Beerli, R.R., Segal, D.J., Flippin, J.D., and Barbas, C.F.** (2001). Development of zinc finger domains for recognition of the 5'-ANN-3' family of DNA sequences and their use in the construction of artificial transcription factors. *J Biol Chem* **276**, 29466-29478.
- Einhauer, A., and Jungbauer, A.** (2001). The FLAG peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins. *J Biochem Biophys Methods* **49**, 455-465.
- Endo, M., Ishikawa, Y., Osakabe, K., Nakayama, S., Kaya, H., Araki, T., Shibahara, K., Abe, K., Ichikawa, H., Valentine, L., Hohn, B., and Toki, S.** (2006). Increased frequency of homologous recombination and T-DNA integration in Arabidopsis CAF-1 mutants. *EMBO J* **25**, 5579-5590.
- Forget, A.L., and Kowalczykowski, S.C.** (2010). Single-molecule imaging brings Rad51 nucleoprotein filaments into focus. *Trends Cell Biol* **20**, 269-276.
- Foster, K.W., and Smyth, R.D.** (1980). Light Antennas in phototactic algae. *Microbiol Rev* **44**, 572-630.
- Foster, K.W., Saranak, J., Patel, N., Zarilli, G., Okabe, M., Kline, T., and Nakanishi, K.** (1984). A rhodopsin is the functional photoreceptor for phototaxis in the unicellular eukaryote *Chlamydomonas*. *Nature* **311**, 756-759.
- Francia, S., Michelini, F., Saxena, A., Tang, D., de Hoon, M., Anelli, V., Mione, M., Carninci, P., and d'Adda di Fagagna, F.** (2012). Site-specific DICER and DROSHA RNA products control the DNA-damage response. *Nature* **488**, 231-235.
- Fuhrmann, M., Oertel, W., and Hegemann, P.** (1999). A synthetic gene coding for the green fluorescent protein (GFP) is a versatile reporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J* **19**, 353-361.
- Fuhrmann, M., Stahlberg, A., Govorunova, E., Rank, S., and Hegemann, P.** (2001). The abundant retinal protein of the *Chlamydomonas* eye is not the photoreceptor for phototaxis and photophobic responses. *J Cell Sci* **114**, 3857-3863.
- Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., and Siksnys, V.** (2012). Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, E2579-2586.
- Gonzalez-Ballester, D., Pootakham, W., Mus, F., Yang, W., Catalanotti, C., Magneschi, L., de Montaigu, A., Higuera, J.J., Prior, M., Galvan, A., Fernandez, E., and Grossman, A.R.**
-

- (2011). Reverse genetics in *Chlamydomonas*: a platform for isolating insertional mutants. *Plant Methods* **7**, 24.
- Govorunova, E.G., Sineshchekov, O.A., and Hegemann, P.** (1997). Desensitization and Dark Recovery of the Photoreceptor Current in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* **115**, 633-642.
- Govorunova, E.G., Jung, K.-H., Sineshchekov, O.A., and Spudich, J.L.** (2004). *Chlamydomonas* sensory rhodopsins A and B: cellular content and role in photophobic responses. *Biophys J* **86**, 2342-2349.
- Guo, H., Duong, H., Ma, N., and Lin, C.** (1999). The Arabidopsis blue light receptor cryptochrome 2 is a nuclear protein regulated by a blue light-dependent post-transcriptional mechanism. *Plant J* **19**, 279-287.
- Guo, H., Kottke, T., Hegemann, P., and Dick, B.** (2005). The phot LOV2 domain and its interaction with LOV1. *Biophys J* **89**, 402-412.
- Guo, J., Gaj, T., and Barbas, C.F., 3rd.** (2010). Directed evolution of an enhanced and highly efficient FokI cleavage domain for zinc finger nucleases. *J Mol Biol* **400**, 96-107.
- Gupta, R.C., Folta-Stogniew, E., and Radding, C.M.** (1999a). Human Rad51 protein can form homologous joints in the absence of net strand exchange. *J Biol Chem* **274**, 1248-1256.
- Gupta, R.C., Folta-Stogniew, E., O'Malley, S., Takahashi, M., and Radding, C.M.** (1999b). Rapid exchange of A:T base pairs is essential for recognition of DNA homology by human Rad51 recombination protein. *Mol Cell* **4**, 705-714.
- H. Harris, P.D., David B. Stern, Ph.D., and George B. Witman, Ph.D.** (2008). *The Chlamydomonas Sourcebook*.
- Halavaty, A.S., and Moffat, K.** (2007). N- and C-terminal flanking regions modulate light-induced signal transduction in the LOV2 domain of the blue light sensor phototropin 1 from *Avena sativa*. *Biochemistry* **46**, 14001-14009.
- Harper, S.M., Neil, L.C., and Gardner, K.H.** (2003). Structural basis of a phototropin light switch. *Science* **301**, 1541-1544.
- Harz.** (1991). **Rhodopsin-regulated calcium currents in *Chlamydomonas***, Hegemann, ed.
- Heyer, W.D., Li, X., Rolfsmeier, M., and Zhang, X.P.** (2006). Rad54: the Swiss Army knife of homologous recombination? *Nucleic Acids Res* **34**, 4115-4125.
- Hocine, S., Singer, R.H., and Grünwald, D.** (2010). RNA processing and export. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a000752.
- Hollingsworth, N.M., and Brill, S.J.** (2004). The Mus81 solution to resolution: generating meiotic crossovers without Holliday junctions. *Genes Dev* **18**, 117-125.

- Hooper, J.K.** (1989). The Chlamydomonas Sourcebook. A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use. Elizabeth H. Harris. Academic Press, San Diego, CA, 1989. xiv, 780 pp., illus. \$145. Science **246**, 1503-1504.
- Hsu, P.D., Lander, E.S., and Zhang, F.** (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. Cell **157**, 1262-1278.
- Hsu, P.D., Scott, D.A., Weinstein, J.A., Ran, F.A., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E.J., Wu, X., Shalem, O., Cradick, T.J., Marraffini, L.A., Bao, G., and Zhang, F.** (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. Nat Biotechnol **31**, 827-832.
- Huala, E., Oeller, P.W., Liscum, E., Han, I.S., Larsen, E., and Briggs, W.R.** (1997). Arabidopsis NPH1: a protein kinase with a putative redox-sensing domain. Science **278**, 2120-2123.
- Huang, K., and Beck, C.F.** (2003). Phototropin is the blue-light receptor that controls multiple steps in the sexual life cycle of the green alga Chlamydomonas reinhardtii. Proc Natl Acad Sci U S A **100**, 6269-6274.
- Im, C.S., Eberhard, S., Huang, K., Beck, C.F., and Grossman, A.R.** (2006). Phototropin involvement in the expression of genes encoding chlorophyll and carotenoid biosynthesis enzymes and LHC apoproteins in Chlamydomonas reinhardtii. Plant J **48**, 1-16.
- Inoue, S., Kinoshita, T., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Doi, M., and Shimazaki, K.** (2008). Blue light-induced autophosphorylation of phototropin is a primary step for signaling. Proc Natl Acad Sci U S A **105**, 5626-5631.
- Inui, M., Miyado, M., Igarashi, M., Tamano, M., Kubo, A., Yamashita, S., Asahara, H., Fukami, M., and Takada, S.** (2014). Rapid generation of mouse models with defined point mutations by the CRISPR/Cas9 system. Sci Rep **4**, 5396.
- Ishikawa, H., and Marshall, W.F.** (2011). Ciliogenesis: building the cell's antenna. Nat Rev Mol Cell Biol **12**, 222-234.
- Iyama, T., and Wilson, D.M.** (2013). DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. DNA Repair (Amst) **12**, 620-636.
- Jakab, G., Mougín, A., Kis, M., Pollák, T., Antal, M., Branlant, C., and Solymosy, F.** (1997). Chlamydomonas U2, U4 and U6 snRNAs. An evolutionary conserved putative third interaction between U4 and U6 snRNAs which has a counterpart in the U4atac-U6atac snRNA duplex. Biochimie **79**, 387-395.
- Jiang, W., Brueggeman, A.J., Horken, K.M., Plucinak, T.M., and Weeks, D.P.** (2014). Successful transient expression of Cas9/sgRNA genes in Chlamydomonas reinhardtii. Eukaryot Cell.
- Jiang, W., Zhou, H., Bi, H., Fromm, M., Yang, B., and Weeks, D.P.** (2013). Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in Arabidopsis, tobacco, sorghum and rice. Nucleic Acids Res **41**, e188.
- Kabadi, A.M., Ousterout, D.G., Hilton, I.B., and Gersbach, C.A.** (2014). Multiplex CRISPR/Cas9-based genome engineering from a single lentiviral vector. Nucleic Acids Res.

- Kass, E.M., and Jasin, M.** (2010). Collaboration and competition between DNA double-strand break repair pathways. *FEBS Lett* **584**, 3703-3708.
- Kateriya, S., Nagel, G., Bamberg, E., and Hegemann, P.** (2004). "Vision" in single-celled algae. *News Physiol Sci* **19**, 133-137.
- Kianianmomeni, A., Stehfest, K., Nematollahi, G., Hegemann, P., and Hallmann, A.** (2009). Channelrhodopsins of *Volvox carteri* are photochromic proteins that are specifically expressed in somatic cells under control of light, temperature, and the sex inducer. *Plant Physiol* **151**, 347-366.
- Kim, J.H., Lee, S.R., Li, L.H., Park, H.J., Park, J.H., Lee, K.Y., Kim, M.K., Shin, B.A., and Choi, S.Y.** (2011). High cleavage efficiency of a 2A peptide derived from porcine teschovirus-1 in human cell lines, zebrafish and mice. *PLoS One* **6**, e18556.
- Kindle, K.L.** (1990). High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 1228-1232.
- Knoll, A., and Puchta, H.** (2011). The role of DNA helicases and their interaction partners in genome stability and meiotic recombination in plants. *J Exp Bot* **62**, 1565-1579.
- Kong, S.-G., Suzuki, T., Tamura, K., Mochizuki, N., Hara-Nishimura, I., and Nagatani, A.** (2006). Blue light-induced association of phototropin 2 with the Golgi apparatus. *Plant J* **45**, 994-991005.
- Kong, S.G., Kinoshita, T., Shimazaki, K., Mochizuki, N., Suzuki, T., and Nagatani, A.** (2007). The C-terminal kinase fragment of Arabidopsis phototropin 2 triggers constitutive phototropin responses. *Plant J* **51**, 862-873.
- Kozminski, K.G., Johnson, K.A., Forscher, P., and Rosenbaum, J.L.** (1993). A motility in the eukaryotic flagellum unrelated to flagellar beating. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 5519-5523.
- Kreimer, G.** (2009). The green algal eyespot apparatus: a primordial visual system and more? *Curr Genet* **55**, 19-43.
- Kuhar, R., Gwiazda, K.S., Humbert, O., Mandt, T., Pangallo, J., Brault, M., Khan, I., Maizels, N., Rawlings, D.J., Scharenberg, A.M., and Certo, M.T.** (2014). Novel fluorescent genome editing reporters for monitoring DNA repair pathway utilization at endonuclease-induced breaks. *Nucleic Acids Res* **42**, e4.
- Kuscu, C., Arslan, S., Singh, R., Thorpe, J., and Adli, M.** (2014). Genome-wide analysis reveals characteristics of off-target sites bound by the Cas9 endonuclease. *Nat Biotechnol* **32**, 677-683.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Li, Z., Wakao, S., Fischer, B.B., and Niyogi, K.K.** (2009). Sensing and responding to excess light. *Annu Rev Plant Biol* **60**, 239-260.

- Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L., and Law, M.** (2012). Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol* **2012**, 251364.
- Lu, Y.** (2006). Functional analysis of phototropin in *Chlamydomonas reinhardtii*. In Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I (Humboldt-Universität zu Berlin).
- Luck, M., Mathes, T., Bruun, S., Fudim, R., Hagedorn, R., Tran Nguyen, T.M., Kateriya, S., Kennis, J.T., Hildebrandt, P., and Hegemann, P.** (2012). A photochromic histidine kinase rhodopsin (HKR1) that is bimodally switched by ultraviolet and blue light. *J Biol Chem* **287**, 40083-40090.
- Maeder, M.L., Thibodeau-Beganny, S., Sander, J.D., Voytas, D.F., and Joung, J.K.** (2009). Oligomerized pool engineering (OPEN): an 'open-source' protocol for making customized zinc-finger arrays. *Nat Protoc* **4**, 1471-1501.
- Mak, A.N., Bradley, P., Cernadas, R.A., Bogdanove, A.J., and Stoddard, B.L.** (2012). The crystal structure of TAL effector PthXo1 bound to its DNA target. *Science* **335**, 716-719.
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K.M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J.E., Norville, J.E., and Church, G.M.** (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* **339**, 823-826.
- Maquat, L.E.** (2004). Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 89-99.
- Mason, S.** (2012). Small RNA-mediated DNA repair. *Nat Struct Mol Biol* **19**, 470.
- Merchant, S.S., Prochnik, S.E., Vallon, O., Harris, E.H., Karpowicz, S.J., Witman, G.B., Terry, A., Salamov, A., Fritz-Laylin, L.K., Marechal-Drouard, L., Marshall, W.F., Qu, L.H., Nelson, D.R., Sanderfoot, A.A., Spalding, M.H., Kapitonov, V.V., Ren, Q., Ferris, P., Lindquist, E., Shapiro, H., Lucas, S.M., Grimwood, J., Schmutz, J., Cardol, P., Cerutti, H., Chanfreau, G., Chen, C.L., Cognat, V., Croft, M.T., Dent, R., Dutcher, S., Fernandez, E., Fukuzawa, H., Gonzalez-Ballester, D., Gonzalez-Halphen, D., Hallmann, A., Hanikenne, M., Hippler, M., Inwood, W., Jabbari, K., Kalanon, M., Kuras, R., Lefebvre, P.A., Lemaire, S.D., Lobanov, A.V., Lohr, M., Manuell, A., Meier, I., Mets, L., Mittag, M., Mittelmeier, T., Moroney, J.V., Moseley, J., Napoli, C., Nedelcu, A.M., Niyogi, K., Novoselov, S.V., Paulsen, I.T., Pazour, G., Purton, S., Ral, J.P., Riano-Pachon, D.M., Riekhof, W., Rymarquis, L., Schroda, M., Stern, D., Umen, J., Willows, R., Wilson, N., Zimmer, S.L., Allmer, J., Balk, J., Bisova, K., Chen, C.J., Elias, M., Gendler, K., Hauser, C., Lamb, M.R., Ledford, H., Long, J.C., Minagawa, J., Page, M.D., Pan, J., Pootakham, W., Roje, S., Rose, A., Stahlberg, E., Terauchi, A.M., Yang, P., Ball, S., Bowler, C., Dieckmann, C.L., Gladyshev, V.N., Green, P., Jorgensen, R., Mayfield, S., Mueller-Roeber, B., Rajamani, S., Sayre, R.T., Brokstein, P., Dubchak, I., Goodstein, D., Hornick, L., Huang, Y.W., Jhaveri, J., Luo, Y., Martinez, D., Ngau, W.C., Otilar, B., Poliakov, A., Porter, A., Szajkowski, L., Werner, G., Zhou, K., Grigoriev, I.V., Rokhsar, D.S., and Grossman, A.R.** (2007). The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. In *Science (United States)*, pp. 245-250.
- Michalik, K.M., Böttcher, R., and Förstemann, K.** (2012). A small RNA response at DNA ends in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res* **40**, 9596-9603.

- Miller, J.C., Holmes, M.C., Wang, J., Guschin, D.Y., Lee, Y.L., Rupniewski, I., Beausejour, C.M., Waite, A.J., Wang, N.S., Kim, K.A., Gregory, P.D., Pabo, C.O., and Rebar, E.J.** (2007). An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol* **25**, 778-785.
- Misteli, T., and Soutoglou, E.** (2009). The emerging role of nuclear architecture in DNA repair and genome maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 243-254.
- Mittelmeier, T.M., Boyd, J.S., Lamb, M.R., and Dieckmann, C.L.** (2011). Asymmetric properties of the *Chlamydomonas reinhardtii* cytoskeleton direct rhodopsin photoreceptor localization. *J Cell Biol* **193**, 741-753.
- Mortazavi, A., Williams, B.A., McCue, K., Schaeffer, L., and Wold, B.** (2008). Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods* **5**, 621-628.
- Nagel, G., Ollig, D., Fuhrmann, M., Kateriya, S., Musti, A.M., Bamberg, E., and Hegemann, P.** (2002). Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae. *Science* **296**, 2395-2398.
- Nagel, G., Szellas, T., Huhn, W., Kateriya, S., Adeishvili, N., Berthold, P., Ollig, D., Hegemann, P., and Bamberg, E.** (2003). Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13940-13945.
- Nelson, J.A., and Lefebvre, P.A.** (1995). Targeted disruption of the NIT8 gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Cell Biol* **15**, 5762-5769.
- Neupert, J., Karcher, D., and Bock, R.** (2009). Generation of *Chlamydomonas* strains that efficiently express nuclear transgenes. *The Plant Journal* **57**, 1140-1150.
- Nultsch, W.** (1983). The photocontrol of movement of *Chlamydomonas*. *Symp Soc Exp Biol* **36**, 521-539.
- Nurizzo, D., Shewry, S.C., Perlin, M.H., Brown, S.A., Dholakia, J.N., Fuchs, R.L., Deva, T., Baker, E.N., and Smith, C.A.** (2003). The crystal structure of aminoglycoside-3'-phosphotransferase-IIa, an enzyme responsible for antibiotic resistance. *J Mol Biol* **327**, 491-506.
- Okajima, K., Aihara, Y., Takayama, Y., Nakajima, M., Kashojiya, S., Hikima, T., Oroguchi, T., Kobayashi, A., Sekiguchi, Y., Yamamoto, M., Suzuki, T., Nagatani, A., Nakasako, M., and Tokutomi, S.** (2014). Light-induced Conformational Changes of LOV1 (Light Oxygen Voltage-sensing Domain 1) and LOV2 Relative to the Kinase Domain and Regulation of Kinase Activity in *Chlamydomonas* Phototropin. *J Biol Chem* **289**, 413-422.
- Onodera, A., Kong, S.-G., Doi, M., Shimazaki, K.-I., Christie, J., Mochizuki, N., and Nagatani, A.** (2005). Phototropin from *Chlamydomonas reinhardtii* is functional in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **46**, 367-374.
- Orel, N., Kyryk, A., and Puchta, H.** (2003). Different pathways of homologous recombination are used for the repair of double-strand breaks within tandemly arranged sequences in the plant genome. *Plant J* **35**, 604-612.

- Ozawa, S., Nield, J., Terao, A., Stauber, E.J., Hippler, M., Koike, H., Rochaix, J.D., and Takahashi, Y.** (2009). Biochemical and structural studies of the large Ycf4-photosystem I assembly complex of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* **21**, 2424-2442.
- Pedersen, L.B., Geimer, S., and Rosenbaum, J.L.** (2006). Dissecting the molecular mechanisms of intraflagellar transport in *chlamydomonas*. *Curr Biol* **16**, 450-459.
- Peers, G., Truong, T.B., Ostendorf, E., Busch, A., Elrad, D., Grossman, A.R., Hippler, M., and Niyogi, K.K.** (2009). An ancient light-harvesting protein is critical for the regulation of algal photosynthesis. *Nature* **462**, 518-521.
- Perez-Pinera, P., Ousterout, D.G., Brown, M.T., and Gersbach, C.A.** (2012). Gene targeting to the ROSA26 locus directed by engineered zinc finger nucleases. *Nucleic Acids Res* **40**, 3741-3752.
- Petroutsos, D., Busch, A., Janssen, I., Trompelt, K., Bergner, S.V., Weinl, S., Holtkamp, M., Karst, U., Kudla, J., and Hippler, M.** (2011). The chloroplast calcium sensor CAS is required for photoacclimation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* **23**, 2950-2963.
- Popov, N., Schmitt, M., Schulzeck, S., and Matthies, H.** (1975). [Reliable micromethod for determination of the protein content in tissue homogenates]. *Acta Biol Med Ger* **34**, 1441-1446.
- Prager, K.** (2012). PROTEINBIOCHEMISCHE UND FUNKTIONELLE UNTERSUCHUNGEN ZUM TIERÄHNLICHEN UND PFLANZLICHEN CRYPTOCHROM AUS CHLAMYDOMONAS REINHARDTII. In BIOLOGISCH-PHARMAZEUTISCHEN FAKULTÄT (Jena: FRIEDRICH-SCHILLER-UNIVERSITÄT JENA).
- Puchta, H., and Hohn, B.** (2012). In planta somatic homologous recombination assay revisited: a successful and versatile, but delicate tool. *Plant Cell* **24**, 4324-4331.
- Radecke, S., Radecke, F., Cathomen, T., and Schwarz, K.** (2010). Zinc-finger nuclease-induced gene repair with oligodeoxynucleotides: wanted and unwanted target locus modifications. *Mol Ther* **18**, 743-753.
- Ramirez, C.L., Certo, M.T., Mussolino, C., Goodwin, M.J., Cradick, T.J., McCaffrey, A.P., Cathomen, T., Scharenberg, A.M., and Joung, J.K.** (2012). Engineered zinc finger nickases induce homology-directed repair with reduced mutagenic effects. *Nucleic Acids Res* **40**, 5560-5568.
- Ramirez-Parra, E., and Gutierrez, C.** (2007). The many faces of chromatin assembly factor 1. *Trends Plant Sci* **12**, 570-576.
- Ran, F.A., Hsu, P.D., Lin, C.Y., Gootenberg, J.S., Konermann, S., Trevino, A.E., Scott, D.A., Inoue, A., Matoba, S., Zhang, Y., and Zhang, F.** (2013). Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell* **154**, 1380-1389.
- Renninger, S., Backendorf, E., and Kreimer, G.** (2001). Subfractionation of eyespot apparatuses from the green alga *Spermatozopsis similis*: isolation and characterization of eyespot globules. *Planta* **213**, 51-63.

- Richardson, C., and Jasin, M.** (2000). Coupled homologous and nonhomologous repair of a double-strand break preserves genomic integrity in mammalian cells. *Mol Cell Biol* **20**, 9068-9075.
- Richardson, C., Moynahan, M.E., and Jasin, M.** (1998). Double-strand break repair by interchromosomal recombination: suppression of chromosomal translocations. *Genes Dev* **12**, 3831-3842.
- Rochaix, J.D.** (1995). *Chlamydomonas reinhardtii* as the photosynthetic yeast. *Annu Rev Genet* **29**, 209-230.
- Rohr, J., Sarkar, N., Balenger, S., Jeong, B.-r., and Cerutti, H.** (2004). Tandem inverted repeat system for selection of effective transgenic RNAi strains in *Chlamydomonas*. *Plant J* **40**, 611-621.
- Rouet, P., Smih, F., and Jasin, M.** (1994). Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. *Mol Cell Biol* **14**, 8096-8106.
- Sahdev, S., Saini, S., Tiwari, P., Saxena, S., and Singh Saini, K.** (2007). Amplification of GC-rich genes by following a combination strategy of primer design, enhancers and modified PCR cycle conditions. *Mol Cell Probes* **21**, 303-307.
- San Filippo, J., Sung, P., and Klein, H.** (2008). Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu Rev Biochem* **77**, 229-257.
- Sander, J.D., Zaback, P., Joung, J.K., Voytas, D.F., and Dobbs, D.** (2007). Zinc Finger Targeter (ZiFIT): an engineered zinc finger/target site design tool. *Nucleic Acids Res* **35**, W599-605.
- Sander, J.D., Reyon, D., Maeder, M.L., Foley, J.E., Thibodeau-Beganny, S., Li, X., Regan, M.R., Dahlborg, E.J., Goodwin, M.J., Fu, F., Voytas, D.F., Joung, J.K., and Dobbs, D.** (2010). Predicting success of oligomerized pool engineering (OPEN) for zinc finger target site sequences. *BMC Bioinformatics* **11**, 543.
- Schaller, K., David, R., and Uhl, R.** (1997). How *Chlamydomonas* keeps track of the light once it has reached the right phototactic orientation. *Biophys J* **73**, 1562-1572.
- Schmidt, M., Gessner, G., Luff, M., Heiland, I., Wagner, V., Kaminski, M., Geimer, S., Eitzinger, N., Reissenweber, T., Voytsekh, O., Fiedler, M., Mittag, M., and Kreimer, G.** (2006). Proteomic analysis of the eyespot of *Chlamydomonas reinhardtii* provides novel insights into its components and tactic movements. *Plant Cell* **18**, 1908-1930.
- Schneider, F., Gradmann, D., and Hegemann, P.** (2013). Ion selectivity and competition in channelrhodopsins. *Biophys J* **105**, 91-100.
- Schroda, M.** (2006). RNA silencing in *Chlamydomonas*: mechanisms and tools. *Curr Genet* **49**, 69-84.
- Schroda, M., Blocker, D., and Beck, C.F.** (2000). The HSP70A promoter as a tool for the improved expression of transgenes in *Chlamydomonas*. *Plant J* **21**, 121-131.



- Schägger, H.** (1994). Electrophoretic isolation of membrane proteins from acrylamide gels. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **48**, 185-203.
- Schönrock, N., Exner, V., Probst, A., Gruissem, W., and Hennig, L.** (2006). Functional genomic analysis of CAF-1 mutants in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **281**, 9560-9568.
- Segal, D.J., Dreier, B., Beerli, R.R., and Barbas, C.F.** (1999). Toward controlling gene expression at will: selection and design of zinc finger domains recognizing each of the 5'-GNN-3' DNA target sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2758-2763.
- Sizova, I.A., Lapina, T.V., Frolova, O.N., Alexandrova, N.N., Akopiants, K.E., and Danilenko, V.N.** (1996). Stable nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* with a *Streptomyces rimosus* gene as the selective marker. *Gene* **181**, 13-18.
- Spexard, M., Thöing, C., Beel, B., Mittag, M., and Kottke, T.** (2014). Response of the Sensory animal-like cryptochrome aCRY to blue and red light as revealed by infrared difference spectroscopy. *Biochemistry* **53**, 1041-1050.
- Sternberg, S.H., Redding, S., Jinek, M., Greene, E.C., and Doudna, J.A.** (2014). DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature* **507**, 62-67.
- Swartz, T.E., Corchnoy, S.B., Christie, J.M., Lewis, J.W., Szundi, I., Briggs, W.R., and Bogomolni, R.A.** (2001). The photocycle of a flavin-binding domain of the blue light photoreceptor phototropin. *J Biol Chem* **276**, 36493-36500.
- Symington, L.S., and Gautier, J.** (2011). Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annu Rev Genet* **45**, 247-271.
- Tollete, D., Ghysels, B., Alric, J., Petroutsos, D., Tolstygina, I., Krawietz, D., Happe, T., Auroy, P., Adriano, J.M., Beyly, A., Cuiné, S., Plet, J., Reiter, I.M., Genty, B., Cournac, L., Hippler, M., and Peltier, G.** (2011). Control of hydrogen photoproduction by the proton gradient generated by cyclic electron flow in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* **23**, 2619-2630.
- Trippens, J., Greiner, A., Schellwat, J., Neukam, M., Rottmann, T., Lu, Y., Kateriya, S., Hegemann, P., and Kreimer, G.** (2012). Phototropin Influence on Eyespot Development and Regulation of Phototactic Behavior in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* **24**, 4687-4702.
- Tsunoda, S.P., and Hegemann, P.** (2009). Glu 87 of channelrhodopsin-1 causes pH-dependent color tuning and fast photocurrent inactivation. *Photochem Photobiol* **85**, 564-569.
- Wah, D.A., Hirsch, J.A., Dorner, L.F., Schildkraut, I., and Aggarwal, A.K.** (1997). Structure of the multimodular endonuclease FokI bound to DNA. *Nature* **388**, 97-100.
- Wei, W., Ba, Z., Gao, M., Wu, Y., Ma, Y., Amiard, S., White, Charles I., Rendtlew Danielsen, Jannie M., Yang, Y.-G., and Qi, Y.** (2012). A Role for Small RNAs in DNA Double-Strand Break Repair. *Cell* **149**, 101-112.

- Weiss, R.L., Goodenough, D.A., and Goodenough, U.W.** (1977). Membrane particle arrays associated with the basal body and with contractile vacuole secretion in *Chlamydomonas*. *J Cell Biol* **72**, 133-143.
- White, R.J.** (2011). Transcription by RNA polymerase III: more complex than we thought. *Nat Rev Genet* **12**, 459-463.
- Wolfe, S.A., Nekludova, L., and Pabo, C.O.** (2000). DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **29**, 183-212.
- Wood, C.R., Wang, Z., Diener, D., Zones, J.M., Rosenbaum, J., and Umen, J.G.** (2012). IFT proteins accumulate during cell division and localize to the cleavage furrow in *Chlamydomonas*. *PLoS One* **7**, e30729.
- Wright, D.A., Townsend, J.A., Winfrey, R.J., Irwin, P.A., Rajagopal, J., Lonosky, P.M., Hall, B.D., Jondle, M.D., and Voytas, D.F.** (2005). High-frequency homologous recombination in plants mediated by zinc-finger nucleases. *The Plant Journal* **44**, 693-705.
- Wright, G.D., and Thompson, P.R.** (1999). Aminoglycoside phosphotransferases: proteins, structure, and mechanism. *Front Biosci* **4**, D9-21.
- Zhang, F., Cong, L., Lodato, S., Kosuri, S., Church, G.M., and Arlotta, P.** (2011). Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription. *Nat Biotechnol* **29**, 149-153.
- Zhu, Q., Dabi, T., and Lamb, C.** (1995). TATA box and initiator functions in the accurate transcription of a plant minimal promoter in vitro. *Plant Cell* **7**, 1681-1689.
- Zorin, B., Hegemann, P., and Sizova, I.** (2005). Nuclear-gene targeting by using single-stranded DNA avoids illegitimate DNA integration in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell* **4**, 1264-1272.
- Zorin, B., Lu, Y., Sizova, I., and Hegemann, P.** (2009). Nuclear gene targeting in *Chlamydomonas* as exemplified by disruption of the PHOT gene. *Gene* **432**, 91-96.